Aus dem Institut für Veterinärmedizin
– Robert von Ostertag-Institut –
des Bundesgesundheitsamtes Berlin

TIERARTENBESTIMMUNG AUS FRISCHEM NATIVEM, GELAGERTEM UND HITZEBEHANDELTEM FLEISCH MIT DER ISOELEKTROFOKUSSIERUNG IN POLYACRYLAMIDGELEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Annemarie Dlabka
Tierärztin aus Löhne (Westf.)

Berlin 1986
Journal-Nr. 1292

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Druck: Copy-Center in Dahlem
Ladenbergstraße 2-4
1000 Berlin 33
Tel. 831 40 25

Aus dem Institut für Veterinärmedizin
- Robert von Ostertag-Institut -
des Bundesgesundheitsamtes Berlin

TIERARTENBESTIMMUNG AUS FRISCHEM NATIVEM, GELAGERTEM UND HITZEBEHANDELTEM FLEISCH MIT DER ISOELEKTROFOKUSSIERUNG IN POLYACRYLAMIDGELEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Annemarie Dlabka
Tierärztin aus Löhne (Westf.)

Berlin 1986

Journal-Nr. 1292

Gedruckt mit Genehmigung des
Fachbereiches Veterinärmedizin der
Freien Universität Berlin

Fachbereichssprecher: Prof. Dr. F. Hörchner
Referent: Prof. Dr. H.-J. Sinell
Korreferent: Prof. Dr. G. Reuter

Tag der Promotion: 16. Juli 1986

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. EINLEITUNG 1

2. LITERATURÜBERSICHT 2

2.1 Methoden zur Tierartendifferenzierung 2

2.1.1 Morphologisch-histologische Methoden 3

2.1.2 Serologische bzw. immunchemische Methoden 3

2.1.3 Elektrophorese 4

2.1.4 Isoelektrofokussierung in Trägerampholyt enthaltenden Polyacrylamidgelen 5

2.1.5 Anwendung elektrophoretischer Methoden zur Bestimmung der Herkunft von Proteinen und der Tierart in Fleisch und Fleischerzeugnissen 8

2.2 Fleisch (Definition) 14

2.2.1 Natives Skelettmuskelgewebe 15

2.2.1.1 Aufbau, Struktur und chemische Zusammensetzung 15

2.2.1.2 Sarkoplasmaproteine 16

2.2.2 Gelagertes Fleisch 17

2.2.2.1 Einfluß der Verpackung auf mikrobiologische und chemisch-physikalische Vorgänge im Fleisch während der Lagerung 17

2.2.2.2 Mikrobiologische und chemische Veränderungen im Fleisch während der Lagerung 18

2.2.3 Hitzebehandeltes Fleisch 20

2.2.3.1 Wärmedenaturierung und Aggregation 20

2.2.3.2 Nachweis der Wärmedenaturierung von Muskelproteinen mit elektrophoretischen Methoden 22

Seite

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN 25

Teil A

3.1 Isoelektrofokussierung zum Nachweis individueller, lokalisationsabhängiger und geschlechtsspezifischer Unterschiede bei Fleischproben 25

3.1.1 Untersuchungsmaterial 25

3.1.2 Methoden 25

3.1.2.1 Probenentnahme 25

3.1.2.2 Probenaufbereitung 26

3.1.2.3 Durchführung der Isoelektrofokussierung in 0,5-mm-Polyacrylamidfertiggelen 27

3.1.3 Darstellung der Ergebnisse 27

3.1.4 Beschreibung und Besprechung der Befunde 30

Teil B

3.2 Einsetzbarkeit der Isoelektrofokussierung zur Tierartenidentifizierung aus gelagertem Fleisch 35

3.2.1 Überblick über den Versuchsablauf 35

3.2.2 Untersuchungsmaterial 36

3.2.3 Methoden 37

3.2.3.1 Bearbeitung des schlachtwarmen Fleisches 37

3.2.3.2 Bearbeitung des 24 Stunden gelagerten Fleisches 37

3.2.3.3 Lagerung der Fleischproben 38

3.2.3.4 Lagerungsbedingungen für aerob und vakuumverpackte Fleischproben 38

3.2.3.5 Untersuchung gelagerter Fleischproben 39

3.2.3.6 Aufbereitung gelagerter Fleischproben 39

3.2.3.7 Durchführung der Isoelektrofokussierung in 0,5-mm-Polyacrylamidfertiggelen 40

Seite

3.2.4 Ergebnisse 40

3.2.4.1 Organoleptische Untersuchungsergebnisse 40

3.2.4.2 pH-Werte 41

3.2.4.3 Pherogramme und Densitogramme 42

3.2.5 Beschreibung und Besprechung der Befunde 44

Teil C *)

3.3 Tierartendifferenzierung aus hitzebehandeltem Fleisch mittels Isoelektrofokussierung und anschließender Silberfärbung 50

3.3.1 Einführung in die Thematik 50

3.3.2 Material und Methoden 51

3.3.2.1 Geräte 51

3.3.2.2 Chemikalien 52

3.3.2.3 Untersuchungsmaterial 53

3.3.2.4 Konservenherstellung 54

3.3.2.5 Extraktherstellung 54

3.3.2.6 Ultradünnschichtfokussierung 54

3.3.2.7 Silberfärbung 55

3.3.3 Auswertung und Besprechung der Befunde 56

4. ZUSAMMENFASSUNG (TEIL A, B UND C) 65

SUMMARY 68

5. LITERATURVERZEICHNIS 71

6. ANHANG (Phero- und Densitogramme aus Teil A und B) 94

*) Veröffentlicht in: Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 98, (4), 130 - 135 (1985)

1. Einleitung

Die Angabe der Tierart bei Fleisch und Fleischerzeugnissen gehört zu den Kennzeichnungsgeboten, die im Rahmen lebensmittelrechtlicher Vorschriften geregelt sind. Sie ist wegen des zunehmenden internationalen Handels mit Fleisch, auch Fleisch außereuropäischer Wildtierarten, zur Zeit besonders aktuell. Auch wegen der Gefahr der Einschleppung und Ausbreitung von Tierseuchen durch infiziertes Fleisch ist die Überwachung der Tierart-Angabe von Bedeutung.

Die Isolektrofokussierung (IEF) ist eine hochauflösende chemisch-physikalische Methode, die sich zur Darstellung extrahierter, in Lösung befindlicher tierartspezifischer Muskelproteine eignet und somit eine Tierartendifferenzierung und -identifizierung ermöglicht. Die IEF ist einfach, bei Verwendung ultradünner Gele auch schnell und kostengünstig durchzuführen und liefert bei exakter Einhaltung aller Parameter reproduzierbare Ergebnisse.

Der Vorteil der elektrophoretischen Methoden im Vergleich zu den häufig angewendeten immunologischen Methoden besteht in der Unabhängigkeit von häufig nur schwer zu erhaltenden brauchbaren Antiseren und in der Möglichkeit, nahe verwandte Tierarten voneinander zu unterscheiden. Die Beschaffung der für die elektrophoretischen Methoden benötigten Referenzfleischextrakte bereitet meist keine schwerwiegenden Probleme.

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zur Untersuchung der Frage liefern, inwieweit die IEF zur Tierartenbestimmung bei frischem und unter verschiedenen Bedingungen gelagertem sowie hitzebehandeltem Fleisch einsetzbar ist.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1 Methoden zur Tierartendifferenzierung

Entsprechend dem zu untersuchenden Material und der zur Verfügung stehenden technischen Ausrüstung sind folgende Methoden zur Tierartenbestimmung mehr oder weniger gebräuchlich:

A) morphologisch-histologisch:

Untersuchungsmaterial: Knochen, Haare, evtl. Muskulatur

B) serologisch bzw. immunchemisch (Nachweis der Antigen-Antikörper-Reaktion):

a) Präzipitationsreaktionen (Röhrchenpräzipitation und Agar-Gel-Diffusionen) variiert und verfeinert durch Markierung von Antigen oder Antikörper mit fluoreszierenden, elektronendichten, radioaktiven oder enzymatischen Gruppen

b) Immunelektrophoresen

c) Antigen-Antikörperreaktionen mit mehr als zwei Komponenten (Hemmreaktionen)

d) Reaktionen unter Beteiligung von Komplement (KABAT 1971)

C) chemisch-physikalisch:

a) elektrophoretische Verfahren (Elektrophoresen und Isoelektrofokussierungen)

b) Chromatographien

2.1.1 Morphologisch-histologische Methoden

Die histologischen Untersuchungen sind aus verschiedenen Gründen nur begrenzt einsetzbar. Typische Gattungsunterschiede im histologischen Aufbau der Muskulatur wurden bisher nur bei Crustaceen, nicht aber bei Säugern festgestellt (GROSSKLAUS 1964). Für die osteologische Bestimmung fehlt in vielen Fällen das Untersuchungsmaterial, weil häufig nur das Muskelfleisch ohne Knochen zur Verfügung steht. Außerdem sind für diese Untersuchung nicht alle Teile des Skeletts gleichermaßen gut geeignet. Die histologische Untersuchung der dem Fleisch anhaftenden Tierhaare ist nur dann vertretbar, wenn eindeutig nachgewiesen ist, daß Fleischprobe und Haare von demselben Tier stammen (LITTERSCHEID u. LAMBARDT 1921; LOCHTE 1938).

2.1.2 Serologische bzw. immunchemische Methoden

Die serologischen Methoden werden seit Jahrzehnten zur Tierartendifferenzierung bei nativem Fleisch angewendet und können darüber hinaus auch zur Spezies-Identifizierung bei hitzebehandelten Muskelproteinen (SINELL 1968a u. b; SINELL u. MENTZ 1969) herangezogen werden. Eine spezielle Anwendung beim Nachweis von Fleischkonserven-Verfälschungen wurde von FROMM et al. (1964) beschrieben.

Die serologischen Verfahren basieren alle auf einer Antigen-Antikörperreaktion. Bei den verschiedenen Verfahren lassen sich die Beurteilungskriterien für eine abgelaufene Reaktion in drei Hauptgruppen einteilen: Präzipitation, Agglutination und Lysis. Die Proteine von Tierarten, die im zoologisch-systematischen Sinne einander nahestehen, verhalten sich je nach dem Grade der Verwandtschaft mehr oder weniger gleichsinnig. Aus diesem Grund ist die

Qualität des verwendeten Antiserums von entscheidender Bedeutung. Die Wertbemessung eines Antiserums richtet sich nach der Menge der in ihm enthaltenen Antikörper und dem Grad ihrer Spezifität (SINELL 1968a).

Die serologischen Methoden haben sich zur Bestimmung der genetisch nicht nahestehenden Tierarten aus nativen und auch aus bis zu einem gewissen Grad hitzebehandelten Muskelproteinen bewährt.

Zur Differenzierung nahe verwandter Tierarten, z.B. Hirsch und Rentier, sind serologische Verfahren allerdings nicht geeignet. Die Bestimmung außereuropäischer Wildtierarten bereitet zusätzliche Probleme, weil qualitativ hochwertige Antiseren nur sehr schwer oder gar nicht erhältlich sind. Hohe Ansprüche an die Spezifität eines Antiserums gehen mit einem erhöhten materiellen, zeitlichen und finanziellen Aufwand einher und beeinträchtigen somit die Wirtschaftlichkeit dieser Methode.

Proteine, die sich anhand ihrer immunologischen Eigenschaften nicht unterscheiden lassen, besitzen aber häufig unterschiedliche chemisch-physikalische Eigenschaften (isoelektrischer Punkt, molare Masse, Größe, Ladung), die eine Differenzierung mittels elektrophoretischer Verfahren ermöglichen.

2.1.3 Elektrophorese

Die in einem elektrischen Gleichspannungsfeld definierter Feldstärke erfolgende Wanderung geladener in Lösung befindlicher Teilchen wird als Elektrophorese bezeichnet. Die Elektrophorese ist eine Methode zur Trennung mittel- bis hochmolekularer Stoffe sowie elektrisch geladener Mi-

kroorganismen und Zellen, sofern sie eine unterschiedliche Ladung aufweisen.

Die Wanderungsgeschwindigkeit der Teilchen ist abhängig von der angelegten Gleichspannung bzw. Feldstärke im Wanderungsmedium oder im Träger, von der Eigenladung des Teilchens und vom Reibungswiderstand, den das Teilchen in dem Träger oder in der Pufferlösung erfährt. Partikelgröße und -form, Struktur und Oberflächenbeschaffenheit des Trägers und die innere Reibung der Pufferlösung bedingen den Reibungswiderstand. Bei konstanter Feldstärke und gleichbleibender, definierter Pufferzusammensetzung ist die Wanderungsgeschwindigkeit nur noch eine Funktion von Ladung, Größe und Gestalt der Teilchen. Auf dieser Basis beruhen reproduzierbare Trennungen von Gemischen aus geladenen Komponenten in den verschiedenen Elektrophoresemethoden. Die bei diesen Trennverfahren registrierten elektrophoretischen Spektren setzen sich dem Stoffgemisch entsprechend aus wenigen oder vielen Fraktionen zusammen (OHLENSCHLÄGER et al. 1980).

2.1.4 Isoelektrofokussierung in Trägerampholyt enthaltenden Polyacrylamidgelen (PAGIF)

Die Isoelektrofokussierung ist eine Methode, mit der Moleküle mit amphoterem Charakter wie Proteine, größere Peptide, Hormone und Enzyme schnell und mit hoher Auflösung nach ihren isoelektrischen Punkten (pI) getrennt werden. Der isoelektrische Punkt ist der pH-Wert, bei dem die Wanderungsgeschwindigkeit eines Ampholyten wegen des Ladungsausgleichs positiver und negativer Ladungen gleich Null ist. Bei der Ionenstärke = 0 ist der isoelektrische Punkt eine physikalische Konstante eines Proteins.

Die Auftrennbarkeit eines Proteingemisches durch die Fokussierung beruht darauf, daß unterschiedliche Proteine entsprechend der Art und Anordnung der in ihnen enthaltenen Aminosäuren unterschiedliche pI-Werte besitzen.

In den Untersuchungen für die vorliegende Arbeit wurden die Fokussierungen in Trägerampholyt enthaltenden Polyacrylamidflachgelen durchgeführt. Das farblose, transparente, elastische und in Wasser unlösliche Polyacrylamid fungiert als stabilisierendes Medium bzw. Trägermaterial. Es ist sehr beständig gegenüber Hitze, pH-Werteinflüssen und Lösungsmitteln. Im Vergleich zu Agarose ist Polyacrylamid elektrisch neutral und verhindert dadurch Elektroosmoseeffekte. Es verhält sich gegenüber zu trennenden Substanzen weitgehend indifferent. Wegen des Fehlens polarer Gruppen kommt es in diesen Gelen nicht zu Proteinabsorptionen.

Um in einem Gel innerhalb einer Trennstrecke einen pH-Gradienten aufzubauen, muß das Gel Trägerampholyte des gewünschten pH-Bereichs enthalten. Trägerampholyte werden durch Reaktion von Acrylsäure mit verschiedenen Polyäthylenpolyaminoverbindungen synthetisiert. Durch Änderung des Verhältnisses zwischen sauren und basischen Gruppen der Ampholyte sowie durch die Wahl eines bestimmten Anteils von CH_2-Gruppen ergibt sich eine Reihe von Molekülen mit unterschiedlichen pI-Werten.

Nach Anlegen des elektrischen Feldes ordnen sich die Einzelkomponenten der in dem Gel enthaltenen Trägerampholyte ihren isoelektrischen Punkten entsprechend an und bilden auf diese Weise einen pH-Gradienten innerhalb einer Trennstrecke. Der pH-Gradient ist die Voraussetzung für die Fokussierung. Die pH-Intervalle, in denen ein pH-Gradient

aufgebaut werden soll, sind in bestimmten Grenzen ebenso variabel wie die Abmessungen (Länge, Breite, Schichtdikke) des Gels.

Der Kontakt der Elektroden zum Trenngel erfolgt durch Elektrodenlösungen, deren pH-Werte kleiner bzw. größer sind als das gewählte pH-Intervall des Trägerampholyten.

Ein Substanzgemisch aus mehreren Komponenten unterschiedlicher isoelektrischer Punkte zeigt Fokussierungen an verschiedenen Stellen des pH-Gradienten. Jede Komponente wird auf ihre in einem eng begrenzten Bereich liegende isoelektrische Position konzentriert bzw. fokussiert. Die Schärfe der Fokussierung wird durch die Ampholytmenge und Steilheit des pH-Gradienten bestimmt. Die Isoelektrofokussierung zeichnet sich im Vergleich mit anderen elektrophoretischen Verfahren dadurch aus, daß sie der Diffusion der Proteine entgegenwirkt (OHLENSCHLÄGER et al. 1980).

Zur Optimierung der Fokussierung wurde nach einem Postulat von RIGHETTI u. DRYSDALE (1976) bezüglich besserer Trennbedingungen und -ergebnisse die Technik zur Herstellung ultradünner (< 0,5 mm) Gele entwickelt (GÖRG et al. 1978; 1979a, b u. c; 1982a u. b). Für die Anwendung sind außer dem hohen Auflösungsvermögen die schnellere Durchführung (kürzere Trennzeiten, schnelleres Färben, Entfärben und Trocknen) und die Kosteneinsparung durch geringeren Reagenzienverbrauch von wesentlicher Bedeutung.

Die bei der Fokussierung entstehenden isoelektrischen Spektren werden auch als Pherogramme oder Proteinmuster bezeichnet. Die Visualisierung der Fokussierergebnisse läßt sich entsprechend der jeweiligen Problemstellung mit verschiedenen Färbetechniken durchführen. Bei der Auswertung

der Pherogramme werden Positionen, Anzahl, Intensität und Ausdehnung der einzelnen Fraktionen bzw. Banden herangezogen und hinsichtlich der genannten Faktoren mit Referenzpherogrammen verglichen.

2.1.5 Anwendung elektrophoretischer Methoden zur Bestimmung der Herkunft von Proteinen und der Tierart in Fleisch und Fleischerzeugnissen

Aufgrund der technischen Variationsmöglichkeiten finden die elektrophoretischen Verfahren zur Untersuchung amphoterer Substanzen einen großen Anwendungsbereich. Entsprechend der jeweiligen Problemstellung unterscheiden sich die eingesetzten elektrophoretischen Verfahren hinsichtlich der Trenntechniken, Trennmedien, Aufbereitung der Proben und Visualisierungstechniken.

Die Weiterentwicklung der elektrophoretischen Techniken wurde wesentlich mitbestimmt durch die Arbeiten von GÖRG et al. (1978; 1979a, b u. c; 1982a u. b), RADOLA (1980) und RIGHETTI u. DRYSDALE (1976), RIGHETTI u. BOSISIO (1982), RIGHETTI (1983).

In der Lebensmitteluntersuchung werden sie außer zur Tierartenidentifizierung aus nativem und erhitztem Fleisch und Fisch z.B. auch zur Sortendifferenzierung pflanzlicher Produkte oder zum Nachweis der Scheinschlachtung bei Schweinen herangezogen.

Hinweise auf die Literatur zur Anwendung elektrophoretischer Verfahren bei der Untersuchung von Fleisch und Fisch sind in Tabelle 1 nach Substraten und Methoden geordnet.

Tab. 1: Publikationen zur Untersuchung von Fleisch und Fisch mit elektrophoretischen Verfahren

Autoren	Untersuchungsmaterial			Untersuchungsverfahren	
	natives Fleisch	hitzebehandeltes Fleisch und Fleischprodukte	Fisch und Fischprodukte	Isoelektro-fokussierung	Elektrophorese
ABRAMS et al. 1983 u. 1984			+	+	
BABIKER et al. 1980/81		+			+
BARTEN 1965	+				+
BAUER 1981	+			+	
BAUER u. STACHELBERGER 1984		+		+	
CRESPO u. OCKERMAN 1977		+			+
DECKER et al. 1985	+			+	
DE WREEDE 1982		+		+	+
DE WREEDE et al. 1982		+		+	+
DE WREEDE u. STEGEMANN 1982		+			+
DLABKA 1984a u. b	+			+	
DLABKA 1985		+		+	
EBERMANN u. BARNA 1972	+				+
EICHLER u. RUBACH 1982			+	+	
FÜHRLING u. GERSONDE 1980	+			+	
GERBER 1980	+			+	
GERBER u. UNTERMANN 1980	+			+	
GILES 1962	+				+
GISSEL 1978	+			+	+
GODAVARI BAI u. RADOLA 1977			+	+	
GÖTZE 1974	+				+
GRUNDHÖFER 1982	+			+	
HEINERT u. KLINGER 1978 u. 1980	+				+
HOFMANN 1973 u. 1978, 1986	+			+	+
HOFMANN u. PENNY 1971		+			+
KAISER et al. 1980a u. b, 1981	+			+	+
KAISER u. KRAUSE 1985	+	+	+	+	+
KING 1978 u. 1984		+		+	
KING u. KURTH 1982	+			+	
KÖNIG 1982	+			+	+
KOSSMANN 1969	+				+
KRZYNOWEK u. WIGGIN 1979			+	+	
LLEWELLYN u. FLAHERTY 1976		+		+	
LUNDSTROM 1979 u. 1981			+	+	
MACKIE 1968			+		+
MACKIE u. TAYLOR 1972			+		+
MÄKINEN et al. 1979		+			+
MATTEY et al. 1970		+			+
MOUSTAFA et al. 1982			+		+
NAUJOK 1985	+			+	
OLSMAN et al. 1969		+			+
PLEIN 1984	+			+	
PROTZ u. DLABKA 1984	+			+	
REHBEIN 1983			+	+	
RING et al. 1982		+			+
RUBACH et al. 1978	+	+		+	
SECCHIA et al. 1980	+			+	
SPELL 1972		+			+
SPELL 1974	+				+
STOLLE u. REUTER 1981	+			+	
STOLLE et al. 1983	+			+	
THOMPSON 1960 und 1962			+		+
THOMPSON 1961	+				+
TINBERGEN u. OLSMAN 1976	+			+	

Natives Fleisch

Elektrophoretische Methoden werden seit ca. zweieinhalb Jahrzehnten für die Darstellung von Sarkoplasmaproteinen zur Tierartendifferenzierung aus Fleisch angewendet. Im Mittelpunkt der Untersuchungen stand die Frage nach der Tierartspezifität der Elektropherogramme. Es wurde ermittelt, ob und in welchem Ausmaß intra- oder/ und interindividuelle Einflüsse zu quantitativen oder sogar qualitativen Pherogrammunterschieden aus tierartidentischem Material führen können. Unterschiedliche Intensitäten identischer Fraktionen werden als q u a n t i t a t i v e , das Fehlen bestimmter, sonst stets vorhandener bzw. das Erscheinen neuer zusätzlicher Banden als q u a l i t a t i v e Pherogrammdifferenzen bezeichnet.

Bei Anwendung der Fokussierung wurden im allgemeinen innerhalb einer Tierspezies keine qualitativen, sondern nur quantitative Pherogrammdifferenzen festgestellt, die in unsystematischer Variation auftraten und die Tierartspezifität der Proteinmuster nicht beeinträchtigten. Quantitative Unterschiede, die die Spezifität der Pherogramme in einigen Fällen erheblich beeinflußten, bildeten die Ausnahme (GISSEL 1978).

Variierende Bandenintensitäten wurden nicht nur als intra- und interindividuell bedingte Unterschiede angesehen, sondern auch als alters- und geschlechtsspezifische Charakteristika interpretiert (KAISER et al. 1980a). Danach soll die Fokussierung über die Tierartenbestimmung hinaus eine Differenzierung nach Altersstufen und Geschlecht bei Rind-, Schaf- und Hühnerfleisch erlauben. Die Untersuchungen wurden mit der PAGE [1], PAGIF [2] und AGIF [3] an

1) Elektrophorese in Polyacrylamidgel
2) Isoelektrofokussierung in Polyacrylamidgel
3) Isoelektrofokussierung in Agarosegel

31 Tierarten (14 Warmblüter, 17 Kaltblüter) durchgeführt. Von SPELL (1974) wurde die Altersdifferenzierung bei Rind und Schaf mit der Elektrophorese beschrieben.

Die quantitativen Differenzen in elektrophoretischen Proteinmustern aus tierartidentischem Fleisch (GILES 1962; GISSEL 1978; KAISER et al. 1980a; KÖNIG 1982; KOSSMANN 1969; LEE und GRAU 1966) sind wahrscheinlich auf Variationen der Gewebebeschaffenheit durch unterschiedliche Einflüsse von physiologischen Faktoren zurückzuführen (HOFMANN 1978). In dieser Hinsicht sind die unterschiedlichen genetischen Anlagen, Altersunterschiede und unterschiedliche Trainingszustände zu berücksichtigen, da sich mit der biochemischen Situation im Organismus die chemischen Parameter in der Muskulatur, z.B. Gesamtstickstoffgehalt und Stickstoffverteilung, verändern (LAWRIE 1970). Auch die Anteile der wasserlöslichen Sarkoplasmaproteine verändern sich in Abhängigkeit von der Stoffwechsellage (BASS et al. 1969). Altersbedingte Pherogrammveränderungen stehen möglicherweise mit der Reduzierung des Anteils an wasserlöslichem Protein mit zunehmendem Alter im Zusammenhang (PERRY 1970). Für die Variationen der Bandenintensitäten sind außer den obengenannten Faktoren auch der Ausblutungsgrad des Tierkörpers und die Lagerung des Fleisches von Bedeutung. Konzentrationsschwankungen in den Pherogrammen treten häufig am Beispiel des Myoglobins und Hämoglobins besonders deutlich hervor (KÖNIG 1982). Die post mortem eintretende Präzipitation der Sarkoplasmaproteine kann durch Temperaturerhöhung oder Zugabe von Salzen oder Säuren beschleunigt werden (LAWRIE 1970). Daraus resultiert, daß die betroffenen Proteinfraktionen in reduzierten Konzentrationen in den Pherogrammen erscheinen.
Auf die Veränderungen von Proteinmustern im Verlauf der Lagerung wird unter 2.2.2.2 näher eingegangen werden.
Die besondere Leistungsfähigkeit elektrophoretischer Methoden wird bei der Bestimmung der Tierarten, die im zoologisch-systematischen Sinne nahe verwandt sind, deutlich. Mit der Porositätsgradienten-Polyacrylamid-Elektrophorese gelang es, in den Proteinmustern aus Haus- und Wildschweinmuskulatur eine Zone darzustellen, die sich bei beiden Arten qualitativ eindeutig unterschiedlich verhielt (KÖNIG 1982). Die Abgrenzung zwischen Haus- und Wildschwein-

fleisch mit der Fokussierung wird von NAUJOK (1985) beschrieben, wobei auf die besondere Eignung der Mm. adductores für die Untersuchung hingewiesen wird. Zum Nachweis von Büffelfleisch und dessen Unterscheidung von anderen Wiederkäuern wurden von BAUER (1981) ultradünne Gele verwendet. Durch Einführung dieser Gele wurden im Vergleich zu den herkömmlichen dickeren Gelen die Trennbedingungen und -ergebnisse verbessert. Kommerziell erhältliche ultradünne Polyacrylamidgele unterschiedlicher pH-Intervalle wurden zur Differenzierung nahe verwandter und serologisch nicht zu unterscheidender Tierarten wie Springbock und Reh oder Rothirsch und Damhirsch herangezogen (DLABKA 1984b). Die Fokussierung in ultradünnen miniaturisierten Fertiggelen kann als Screening-Test zur Tierartenbestimmung in der Lebensmittelüberwachung von Interesse sein (GRUNDHÖFER 1982). NAUJOK (1985) untersuchte Haus- und Wildtierfleischproben mit der PAGIF unter den Gesichtspunkten der Reifung bei +4 °C bis zu 8 Tagen und der Probenauswahl der Muskulatur sowie des Alters und der Haltung der Tiere. Hinsichtlich der muskeltopographisch bedingten Einflüsse werden in dieser Arbeit Pherogrammunterschiede zwischen sogenannter roter und weißer Muskulatur und deren Bedeutung für die Auswertung beschrieben. Danach ist es für eine eindeutige Tierartendifferenzierung erforderlich, daß die zur Untersuchung eingesetzte Fleischprobe nur aus roter oder nur aus weißer Muskulatur besteht. Eine Mischung beider Muskelgruppen kann die Interpretation erschweren. Der Autor kommt zu der Schlußfolgerung, daß die PAGIF ein aussagekräftiges Verfahren zur Tierartendifferenzierung ist. Elektrophoretische Untersuchungsergebnisse von Proteinen tierischer und pflanzlicher Herkunft sind in einer Literaturarbeit von KAISER u. KRAUSE (1985) zusammengestellt worden.

Hitzebehandeltes Fleisch

Die elektrophoretischen Techniken zur Tierartenbestimmung werden inzwischen nicht nur zur Untersuchung nativen, sondern auch hitzebehandelten Fleisches eingesetzt. Die Speziesdifferenzierung aus hitzebehandeltem Material läßt sich jedoch nicht in allen Fällen problemlos anwenden, weil die Darstellbarkeit der Proteine mit zunehmender Denaturierung abnimmt. Um eine möglichst niedrige Nachweisbarkeitsgrenze zu erzielen, wurde die Proteinlöslichkeit im

hitzebehandelten Material mit geeigneten Reagenzien erhöht (DE WREEDE u. STEGEMANN 1982; DE WREEDE et al. 1982; MATTEY et al. 1970) oder eine sensiblere Färbetechnik angewendet (DLABKA 1985; KING 1984). Untersuchungen nativer und hitzebehandelter (60 °C - 100 °C) Fleischproben von einigen Haus- und Wildtierarten wurden von DECKER et al. (1985) mit Hilfe der Fokussierung und der anschließenden unspezifischen Coomassie-Blue-Färbung durchgeführt. Diese Arbeit bezieht sich im wesentlichen auf die Inaugural-Dissertation von PLEIN (1984). Bei den von DECKER et al. (1985) beschriebenen Untersuchungen wurde mit zunehmender Erhitzung der Fleischproben eine deutliche qualitative und quantitative Abnahme der Banden festgestellt. Eine eindeutige Tierartendifferenzierung war nur bis zu einer Kerntemperatur von 75 °C möglich. Mit der Stärkegel-Elektrophorese wurden aus hitzebehandeltem (bis zu 6 min. bei 120 °C) Rind-, Schaf-, Schweine-, Kaninchen- und Pferdefleisch tierartspezifische Pherogramme dargestellt (MATTEY et al. 1970). Von diesen Autoren wurde auch eine quantitative Bestimmung von hitzebehandelten Fleischmischungen aus Rinder- und Kaninchenmuskulatur durchgeführt. Untersuchungen hinsichtlich der Veränderungen der Proteine bei verschiedener Hitzebelastung am Beispiel der Brühwurst ergaben, daß bei hocherhitzten Proben nur die Fokussierung in Polyacrylamid verwertbare Ergebnisse lieferte (DE WREEDE et al. 1982). Durch selektive Anfärbung der Enzyme Adenylatkinase bzw. Creatinase gelang die Speziesdifferenzierung aus maximal bis auf 120 °C erhitztem Fleisch (KING 1984). Mit Hilfe der sehr empfindlichen Silberfärbung konnte das Fleisch vom Rind, Schwein, Schaf und Känguruh aus Langlagerkonserven differenziert werden (DLABKA 1985).

Zur Untersuchung von nativen, marinierten und hitzebehandelten F i s c h p r o b e n wurden verschiedene elektrophoretische Techniken und verschiedene Gele angewendet. Die Proteinmuster aus nativem Material waren in allen Fällen spezifisch und reproduzierbar (ABRAMS et al. 1983 u. 1984; LUNDSTROM 1979; RUBACH et al. 1978), woraus eine Anwendbarkeit katalogisierter tierartspezifischer schematisch dargestellter Pherogramme gefolgert wurde (ABRAMS et al. 1983 u. 1984). Bei der Untersuchung von Fischprodukten, die aus dem Fleisch von zwei Fischspezies bestanden, war die in der geringeren Konzentration vorkommende Komponente nur dann erkennnbar, wenn ihr prozentualer Anteil mehr als 20 % betrug (RUBACH et al. 1978).

Die Identifizierung erhitzter Fischproben (< 70 °C) und Fischprodukte (< 50 °C) sowie marinierter Fische mit der Isoelektrofokussierung wurde von ABRAMS et al. (1984) beschrieben. Tierartspezifische Proteinmuster aus hitzebehandeltem Fisch, aus Räucherfisch, Marinaden und anderen Fischkonserven konnten aber auch mit der Disk-Elektrophorese (MACKIE 1968; MACKIE u. TAYLOR 1972) oder der Fokussierung in harnstoffhaltigen Gelen (EICHLER u. RUBACH 1982) erzielt werden. KRZYNOWEK u. WIGGIN (1979) wendeten zur Differenzierung gekochten Krabbenfleisches von 8 Spezies die Dünnschichtfokussierung an.

2.2 Fleisch

Das Fleischbeschaugesetz in der Bekanntmachung der Neufassung vom 28. 9. 1981 (BGBl. I S. 1045) definiert in § 3 Abs. 1 Nr. 4 den Begriff "Fleisch" wie folgt:
"Fleisch:
Alle Teile der in § 1 genannten Tiere, frisch oder zubereitet, die zum Genuß für Menschen geeignet sind." (In § 1 sind folgende Tiere genannt: Rinder, Schweine, Schafe, Ziegen, andere Paarhufer, Pferde, andere Einhufer, Kaninchen, Hunde und Haarwild).

Im Deutschen Lebensmittelbuch (Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse 1984) wird ausgeführt:
"1. Fleisch sind alle Teile von geschlachteten oder erlegten warmblütigen Tieren, die zum Genuß für Menschen bestimmt sind.
1.1. Bei der gewerbsmäßigen Herstellung von Fleischerzeugnissen wird unter 'Fleisch' nur Skelettmuskulatur mit anhaftendem oder eingelagertem Fett- und Bindegewebe sowie eingelagerten Lymphknoten, Nerven, Gefäßen und Schweinespeicheldrüsen verstanden."

2.2.1 Natives Skelettmuskelgewebe

2.2.1.1 Aufbau, Struktur und chemische Zusammensetzung

Die am Knochengerüst sich anheftenden Muskeln werden als Skelettmuskulatur bezeichnet. Die Zellen des Skelettmuskelgewebes sind zu schlauchförmigen Zellverbänden als Fasern (Ø 20 - 60 µm) angeordnet. Die Zellkerne liegen peripher unmittelbar am Sarkolemm. Mehrere parallel verlaufende Fasern sind durch eine zarte bindegewebige Hülle (Perimysium internum) zu einem Bündel (Primärbündel) zusammengefaßt. Zahlreiche Primärbündel werden von stärkeren Bindegewebshüllen (Perimysium externum, interstitielles Bindegewebe) zu bereits mit dem bloßen Auge sichtbaren Fleischfasern zusammengehalten. Aus den Fleischfasern baut sich schließlich der von einer Bindegewebshülle (Epimysium) umschlossene Muskel auf (LINKE 1968).

Innerhalb des Sarkolemms befinden sich geformte Eiweißbausteine, die Myofibrillen. Sie sind von einer flüssigen Phase, dem Sarkoplasma und dem sarkoplasmatischen Retikulum umgeben. Das Sarkoplasma besteht aus einer serösen Flüssigkeit, der Matrix und den Grana.

Die Myofibrillen setzen sich aus parallel laufenden Filamenten zusammen, die aus Molekülen der kontraktilen Proteine Myosin (dicke Filamente) und Aktin (dünne Filamente) bestehen. Entsprechend der Organisation der Myofibrillen wird zwischen glatter und quergestreifter Muskulatur unterschieden. Die quergestreifte Muskulatur erhielt diese Bezeichnung infolge der Unterteilung ihrer rhombenförmig parallel angeordneten Myofibrillen in Segmente verschiedener Lichtbrechung, die eine Querstreifung im mikroskopischen Bild erzeugen.

Der gesamte Skelettmuskelgewebsanteil im Schlachtkörper beträgt bei Rindern 49 - 68 %, bei Schweinen 36 - 64 %. Muskulatur besteht chemisch aus Wasser, Eiweißen, Fett, Kohlenhydraten, Enzymen und Vitaminen. Die prozentuale chemische Zusammensetzung kann näherungsweise folgendermaßen angegeben werden: 75 % Wasser, 18 % Protein, 3,5 % lösliche proteinfreie Substanzen, 3 % Fett (LAWRIE 1970).

2.2.1.2 Sarkoplasmaproteine

Das Sarkoplasma besteht aus Wasser, Salzen, Proteinen und organischen N-Verbindungen. Im Sarkoplasma sind die Mitochondrien, Lysosomen, Liposomen, Glykogengranula und das sarkoplasmatische Retikulum lokalisiert. Die Mitochondrien enthalten die Enzyme des Citratcyclus und der Atmungskettenphosphorylierung. Die Lysosomen sind Träger der Hydrolasen und Kathepsine. Das Sarkoplasma beansprucht 20 - 23 % des Volumens und enthält ca. 30 % des in der Muskulatur vorhandenen Proteins. Es gehört zu den Sphäroproteinen, wie sie auch im Blut und in den Zellsäften vorhanden sind. Diese Eiweiße sind in reinem Wasser oder in Salzlösungen löslich. Ihre Löslichkeit nimmt im allgemeinen durch Erhöhung der Salzkonzentration zu. Die Sphäroproteine werden unterteilt in Albumine und Globuline. Die Albumine lösen sich sowohl in reinem Wasser als auch in verdünnten Salzlösungen. Die Globuline hingegen sind nur in verdünnten Salzlösungen, aber nicht in reinem Wasser löslich (HOFMANN 1982).

2.2.2 Gelagertes Fleisch

2.2.2.1 Einfluß der Verpackung auf mikrobiologische und chemisch-physikalische Vorgänge im Fleisch während der Lagerung

Verpackungs- und Aufbewahrungsmodifikationen führen zur Ausbildung unterschiedlicher Biotope (REUTER 1972). Die Verpackung dient zum Schutz des Füllgutes gegen nachteilige chemische, physikalische und biologisch-hygienische Veränderungen. Der Einfluß der Verpackung auf diese Faktoren hängt bei chemisch inerten Verpackungsmaterialien wesentlich von ihrer Licht-, Gas- und Wasserdampfdurchlässigkeit ab.

Eine Verpackung aus durchlässigem Material bietet lediglich einen Schutz gegen zusätzliche Kontaminationen, ohne den Verderb zu verzögern. In undurchlässigen, hermetisch verschlossenen Packungen sind die Mikromilieu-Bedingungen durch folgende Faktoren charakterisiert: gleichbleibende oder sogar erhöhte Wasserdampfspannung, Bildung von Metaboliten, die sich anreichern, vor allem CO_2, Verbrauch von Sauerstoff und damit einhergehende Verschiebung des Redoxpotentials, eventuell auch des pH-Wertes. Darüber hinaus werden Wachstum und Aktivitäten von Mikroorganismen durch die Substrateigenschaften des verpackten Lebensmittels, die Lagertemperatur und die kompetitiven Effekte der jeweiligen Flora-Assoziation bestimmt (SINELL 1985).

2.2.2.2 Mikrobiologische und chemische Veränderungen im Fleisch während der Lagerung

Die in der vorliegenden Arbeit mit der Fokussierung untersuchten Fleischproben wurden bei -18 °C, +4 °C, +10 °C und +20 °C in durchlässigen bzw. undurchlässigen evakuierten Packungen ohne Schutzgase bis zu vier Wochen, bei -18 °C bis zu drei Monaten, gelagert. Von der Gefrierlagerung abgesehen, können sich unter diesen Bedingungen sowohl aerobe als auch mikroaerophile Keime, die nach ihren optimalen Wachstumstemperaturen als psychro- bzw. mesophil zu bezeichnen sind, vermehren.

Der Verderb des Fleisches wird durch fauligen Geruch, schlechten Geschmack, Schleimbildung und Farbveränderungen sinnfällig (LAWRIE 1970).

Auf der Oberfläche frischen Fleisches wird üblicherweise die Pseudomonas-Acinetobacter-Moraxella-Assoziation vorgefunden. Im Kühlbereich werden Hefen, Schimmelpilze und die meisten grampositiven Keime unterdrückt. Bei beginnendem Verderb ist zwar eine Geruchsabweichung und Oberflächenschmiere, aber kein Proteinabbau feststellbar (ICMSF 1980; JAY 1978).

Bacillaceae, Mikrokokken und Enterobacteriaceae bilden bei mittleren Temperaturen die dominierende Flora der Oberflächenfäulnis. Mit fortschreitender Lagerung setzt sich bei abnehmender Wasseraktivität eine grampositive Flora durch. Graue bis graugrünliche Farbveränderungen und eine zunächst stumpfe, später feucht-schmierige Oberflächenbeschaffenheit neben einem muffig-dumpfen, stickigen oder fäulnisartigen Geruch lassen den Verderb deutlich werden (SINELL 1985).

Bei vakuumverpacktem Frischfleisch wird der ursprünglich noch vorhandene Sauerstoff durch mikrobielle Tätigkeit gegen CO_2 ausgetauscht, welches zu einer Umschichtung der Mikroflora führt (REUTER 1972). Aus der anfänglichen Mischflora entwickelt sich bald ein zunächst von gramnegativen Keimen beherrschtes Milieu, in dem sich mit zunehmender Lagerdauer eine Laktobazillenflora mit entsprechender sinnfälliger Säurebildung in den Vordergrund schiebt (SINELL 1985).

Zur Bestimmung des Ausmaßes der Fleischzersetzung durch Bakterien- und Pilzbesiedlung existieren objektive chemische Testverfahren. Trotzdem hat die subjektive Feststellung der oberflächlichen Symptome bei verdorbenem Fleisch durch den Menschen ihre Bedeutung nicht verloren (LAWRIE 1970).

Mit dem Auflösen der Totenstarre beginnt die "Post-rigor-Phase", in der sich die eigentliche Reifung des Fleisches vollzieht (HAMM 1972). Die Fleischreifung ist ein durch fleischeigene Enzyme hervorgerufener Prozeß und durch den Verbrauch der muskeleigenen Glucose und Glykogenreserve, pH-Wertsenkung, Aromabildung und zunehmende Zartheit gekennzeichnet.

Während der Lagerung des Fleisches tritt durch Reifung und mikrobiellen Zerfall eine Veränderung der Eiweiße ein, die sich neben verschiedenen anderen Kriterien in der veränderten Extrahierbarkeit äußert (MEIENHOFER u. ZAHN 1960; STROBL 1957; WEINBERG u. ROSE 1960), woraus ein Spezifitätsverlust der Proteinspektren resultiert.

Dieser Spezifitätsverlust wurde nicht nur mit elektrophoretischen Methoden, sondern auch mit der Chromatographie und der Ultrazentrifugation festgestellt. Mit zunehmender Fleischreifung verringerte sich die Anzahl der trennbaren Proteine. Als Folge des Proteinabbaues in gelagerten Fleischproben trat eine graduelle Abnahme und Abwandlung verschiedener Komponenten auf (FUJIMAKI u. DEATHERAGE 1964; KRONMANN u. WINTERBOTTOM 1960; SHARP 1963; RAMPTON et al. 1965). Außer dem völligen Verschwinden von Pherogrammanteilen wurden Abschwächungen und Intensivierungen einzelner Banden sowie das Auftreten neuer Fraktionen beobachtet (ABERLE u. MERKEL 1966, RAMPTON et al. 1965).

2.2.3 Hitzebehandeltes Fleisch

2.2.3.1 Wärmedenaturierung und Aggregation

Die wesentlichsten Veränderungen des Fleisches beim Erhitzen beruhen auf Denaturierung. Unter Denaturierung ist eine nichtproteolytische Umwandlung spezifischer Eiweißstrukturen zu verstehen, die Veränderungen chemischer, physikalischer und biochemischer Eigenschaften bewirkt (EGLI 1965). Die Wärmedenaturierung geht mit einer Änderung der Tertiär-, z.T. auch der Sekundärstruktur durch Sprengung intramolekularer Bindungen niedriger Energiestufen (Wasserstoffbrücken, Salzbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen) einher (HAUROWITZ 1960; JAENICKE 1965).

Bei der Erhitzung der Proteine findet außer der Wärmedenaturierung die als Koagulation sichtbare Aggregation statt. Sie beruht auf der intermolekularen Betätigung der im nativen Zustand abgesättigten Nebenvalenzen und Disulfidbrücken, wodurch sich benachbarte Moleküle mitein-

ander verbinden. Auf diese Weise entstehen Aggregate aus koaguliertem Eiweiß. Die Erhöhung des Partikelgewichtes durch Aggregatbildung und die Denaturierung sind zwei Vorgänge, die einander überlagern, aber nicht notwendig bedingen (JAENICKE 1965).

Im allgemeinen führt die Denaturierung von Eiweißen zu einer größeren Reaktionsfähigkeit verschiedener chemischer Gruppen, einer Veränderung in Form und Größe der Moleküle, einer Abnahme der Löslichkeit, Kristallisierbarkeit und biologischen Aktivität sowie aufgrund der Aggregatbildung zu einer Viskositätszunahme (HAUROWITZ 1960; JAENICKE 1965).

Die Wärmedenaturierung ist ein Vorgang, bei dem zwischen nativem und denaturiertem Protein Zwischenstufen verschiedener Art und Ausmaße, abhängig von der thermischen Belastung, der Art des Proteins und des Mediums, auftreten können.

Eine Eiweißdenaturierung kann außer durch Wärmeeinwirkung z.B. auch durch Chemikalien (organische Lösungsmittel, anorganische Elektrolyte etc.), energiereiche Strahlung oder mechanische Kräfte hervorgerufen werden.

Der Eintritt der Wärmedenaturierung und Koagulation ist durch die Erhitzungsgeschwindigkeit steuerbar. Je schneller der Temperaturanstieg erfolgt, umso niedriger liegt die Denaturierungstemperatur (COHEN 1966). Mit der Denaturierung geht eine Änderung des Puffervermögens, des pH-Wertes und des isoelektrischen Punktes einher (HAMM u. DEATHERAGE 1960; HAUROWITZ 1960). Die Verschiebung des pH-Wertes und des isoelektrischen Punktes in Richtung höherer pH-Werte beruht auf einer Zunahme an verfügbaren basischen Gruppen des Muskeleiweißes. Durch Auffaltung des Actomyosinkomplexes während des Erhitzens werden

Imidazol-Gruppen des Histidins, die in den nativen Myofibrillen 'maskiert' sind, freigesetzt (HAMM 1965 u. 1977). Die Denaturierung beginnt bereits bei nur leicht erhöhten Temperaturen. Schon bei Erwärmung des Fleisches auf +40 °C treten Denaturierung und Koagulation auf (HAMM 1965). Die stärkste Wärmekoagulation tritt bei Temperaturen zwischen +50 °C und +70 °C ein (LEE u. GRAU 1966). Nach Untersuchungen von HAMM u. DEATHERAGE (1960) ist bei +65 bis +66 °C die Denaturierung größtenteils abgeschlossen, aber nicht vollständig beendet. Von den bei +20 °C löslichen Proteinen sind nach dem Erwärmen nur noch 23 % extrahierbar.

Zu den auffälligsten Veränderungen des Fleisches während der Wärmebehandlung gehört die durch Oxidation des Myoglobins hervorgerufene Farbänderung von rot nach graubraun. Die Denaturierung des Myoglobins beginnt bei +65 °C (HAMM 1977).

2.2.3.2 Nachweis der Wärmedenaturierung von Muskelproteinen mit elektrophoretischen Methoden

Die mit der Elektrophorese durchgeführten Untersuchungen einzelner Proteinfraktionen hinsichtlich ihrer Wärmekoagulationsbereiche basieren darauf, daß nur gelöste Eiweiße im elektrischen Feld wandern und somit auch im Pherogramm erscheinen.

Die in der Elektrophorese am schnellsten wandernden Eiweiße reagierten bei Erwärmung am empfindlichsten (LEE u. GRAU 1966). Die kathodisch wandernden Proteine verhielten sich im Vergleich zu den anodisch wandernden thermolabiler. Bei der gelelektrophoretischen Untersuchung des Rindfleisches wurde bereits bei +30 °C eine ungünsti-

ge, ab +50 °C eine starke Temperaturbeeinflussung festgestellt. Bei der Erhitzung über +66 °C konnte allerdings auch noch nicht denaturiertes Eiweiß nachgewiesen werden.

In elektrophoretischen Auftrennungen aus auf +70 °C erhitztem Fleisch waren nur noch Spuren von Eiweiß sichtbar. Bei Temperaturen über +80 °C traten neue Banden, evtl. Abbauprodukte des Kollagens, in den Pherogrammen auf. Zwischen +70 °C und +150 °C konnte immer noch eine merkbare Proteindenaturierung festgestellt werden (GRAU 1969).

Die durch die Denaturierung hervorgerufenen veränderten Eigenschaften der Muskelproteine dienen als Kriterien zur Beurteilung der ausreichenden Erhitzung von Fleischkonserven. CORETTI (1957) publizierte eine Schnellmethode zum Nachweis der ausreichenden Erhitzung von Dosenschinken, wobei die Löslichkeitsverminderung der Sarkoplasmaeiweiße bei der Koagulationsprobe von entscheidender Bedeutung ist. Bei Fleischextrakten aus nicht ausreichend erhitzten Konserven wurde eine fein- bis grobflockige Ausfällung beobachtet, die bei den Extrakten aus ausreichend erhitzten Fleischkonserven ausblieb.

Zu dieser Thematik wurden auch elektrophoretische Untersuchungen mit Extrakten aus Kochschinken durchgeführt (COHEN 1966). Ein Teil der im nativen Extrakt vorhandenen Proteine wurde bei ausreichender Erhitzung des Schinkens unlöslich, während fünf relativ hitzebeständige Fraktionen löslich blieben und Banden im Pherogramm erzeugten.

Auch die Immunelektrophorese wurde zum Erhitzungsnachweis von Kochschinken verwendet (SCHMOLDT 1969; SINELL u.

SCHMOLDT 1972). Mit dieser Methode lassen sich außer der Verminderung der Löslichkeit und der serologischen Aktivität auch Veränderungen der Ladungsgröße erfassen.

Von PFEIFFER et al. (1969 u. 1970) wurde der Carbesterasetest entwickelt, der durch den Nachweis der im Fleisch vorkommenden hoch temperaturresistenten Carbesterase Rückschlüsse auf die vorausgegangene Hitzeeinwirkung auf Fleisch und Fleischerzeugnisse ermöglicht.

3. Eigene Untersuchungen

Teil A

3.1 Isoelektrofokussierung zum Nachweis individueller, lokalisationsabhängiger und geschlechtsspezifischer Unterschiede bei Fleischproben

3.1.1 Untersuchungsmaterial

Für die Untersuchungen wurde das Fleisch von 14 Rindern (schwarz-bunt, ♂, 12 Monate alt, Gewichte: ca. 400 kg/Tier), 4 Hausschweinen (Deutsche Landrasse, 2 ♀, 2 ♂ kastriert, Gewicht: ca. 100 kg/Tier) und 10 Minipigs (6 ♀, 4 ♂, 12 Monate alt, Gewicht: ca. 35 kg/Tier) verwendet.

Die Versuchstiere wurden im Bundesgesundheitsamt unter tierartspezifischen Haltungs- und Fütterungsbedingungen aufgezogen. Die Hausschweine und die Minipigs stammten aus mehreren Würfen. Die Schlachtung wurde fachgerecht durchgeführt. Außergewöhnliche motorische und emotionelle Belastungen der Tiere im Zusammenhang mit der Schlachtung wurden nicht beobachtet. Bei der vorgeschriebenen amtlichen Fleischuntersuchung wurde das Fleisch als "tauglich" beurteilt. Die Tierkörper wurden anschließend in Hälften (bei Schweinen) bzw. Vierteln (bei Rindern) im Kühlraum bei +4 °C gelagert.

3.1.2 Methoden

3.1.2.1 Probenentnahme

24 Stunden nach der Schlachtung wurden jeweils 2 Parallelproben (ca. 100 g/Probe) aus folgenden Teilstücken entnommen:

Tierart	Teilstücke
Rind	Roastbeef Filet Keule
Hausschwein	Bug Kamm Kotelett Filet Schinken
Minipig	Bug Kamm Kotelett Filet Schinken

Die Fleischproben wurden aus verschiedenen Muskelgruppen der angegebenen Teilstücke entnommen.

3.1.2.2 Probenaufbereitung

7 g fett- und bindegewebsarmes feinzerkleinertes Fleisch wurde im Sorvall-Omnimixer (Fa. Dupont) mit 14 g destilliertem Wasser von $<4\ ^{\circ}C$ unter Eiswasserkühlung 3mal 20 Sekunden, mit Unterbrechungen von jeweils 30 Sekunden, mit 16 000 U/min homogenisiert.

Anmerkung Das zum Homogenisieren verwendete gekühlte destillierte Wasser, die äußere Eiswasserkühlung und das Unterbrechen des Homogenisierens wirkten einer Überhitzung und einer damit verbundenen Denaturierung der Proteine entgegen.

Das Homogenisat wurde 15 Minuten in einer auf $-10\ ^{\circ}C$ eingestellten Kühlzentrifuge (Heraeus-Christ) mit einer Zentrifugalbeschleunigung von 2 000 g zentrifugiert. Der von einer evtl. vorhandenen Fettschicht befreite Überstand wurde durch ein Faltenfilter (Schleicher & Schüll, Nr. $595\frac{1}{2}$, / 110 mm) filtriert. Die Filtrate wurden in

1-ml-Portionen abgefüllt und bis zum Einsatz in der Fokussierung bei -80 °C gelagert.

Die aufgetauten Fleischextrakte wurden unmittelbar vor der Fokussierung einer quantitativen Proteinbestimmung nach der Biuretmethode (Eppendorf-Analysensystem, AV 532 MS) unterzogen und durch entsprechendes Verdünnen mit destilliertem Wasser auf 1 % Protein eingestellt. Da der Proteingehalt der zu untersuchenden Extrakte zwischen 1,5 und 2,4 % lag, wurde nicht die für die Serumuntersuchung empfohlene 6prozentige, sondern eine aus Humanalbumin bestehende 2prozentige Standardlösung verwendet.

3.1.2.3 Durchführung der Isoelektrofokussierung in 0,5-mm-Polyacrylamidfertiggelen

Die Isoelektrofokussierung wurde nach der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG 06.00-17 "Nachweis der Tierart aus frischem nativem Muskelfleisch in Polyacrylamidgelen mit Hilfe der Isoelektrofokussierung (PAGIF)" durchgeführt. Diese Methode wurde in Anlehnung an die den Ampholine PAGplates (Fa. LKB) beiliegende Gebrauchsanweisung erarbeitet.

3.1.3 Darstellung der Ergebnisse

Die Untersuchungsergebnisse wurden entweder als Original-Pherogramme oder Densitogramme dargestellt. Weil bei der Wiedergabe der Pherogramme Qualitätseinbußen aufgrund drucktechnischer Probleme zu erwarten waren, wurden für den größten Teil der Darstellungen Densitogramme verwendet.

Die einzelnen Phero- bzw. Densitogramme dienen als repräsentative Beispiele für ein zahlenmäßig größeres Material.

Die bei der densitometrischen Darstellung zu jedem Peak angegebene Retentionszeit [min] kennzeichnet die Position der Bande in bezug auf den für die Auswertung willkürlich gewählten Startpunkt (= O-Punkt) und in Abhängigkeit von der Scangeschwindigkeit. Da die Startpunkte von Gel zu Gel nicht völlig identisch waren und außerdem eine durch eventuelle pH-Gradientenverschiebung hervorgerufene Positionsänderung von Banden nicht gänzlich ausgeschlossen werden konnte, wurden bei der Auswertung nur jeweils die auf e i n e r Gelplatte produzierten Proteinmuster miteinander verglichen.

Die Eigenabsorption des Gels und der unspezifische, zwischen den scharf abgegrenzten Banden befindliche 'background' wurden bei jedem Gel an einer entsprechend geeigneten Stelle gemessen und bei der nachfolgenden densitometrischen Darstellung der Pherogramme selbsttätig von den gemessenen Absorptionen der einzelnen Banden subtrahiert. Die Banden wiesen zum Teil an ihren oberen und unteren Begrenzungen geringere Intensitäten auf, so daß als Abtastspur für den Laserstrahl die Mitte des Pherogramms gewählt wurde.

Bei der densitometrischen Auswertung ist eine Proteinquantifizierung im Prinzip anhand des an Eiweiß gebundenen Farbstoffs möglich. Da aber bei den vorliegenden Untersuchungsergebnissen die nicht in allen Proteinkonzentrationsbereichen linear verlaufende Coomassie-Blue-Färbung angewendet wurde, konnte die IEF in diesem Fall nur bedingt quantitativ auswertbare Ergebnisse liefern. Die Beziehung zwischen Proteinmasse und proteingebundenem Farbstoff ist bei Anfärbung mit Coomassie-Blue erst oberhalb eines gewissen Schwellenwertes der Proteinkonzentration linear (BURGER et al. 1983). Außerdem zeigte sich, daß die Flecken niedermolekularer Proteine farb-

schwächer waren als nach dem Molekulargewicht zu erwarten war. Weiterhin konnte ermittelt werden, daß in proteinarmen Gelen der Quotient Farbstoffgehalt : Proteingehalt während des Entfärbevorganges stärker als in proteinreichen Gelen sank. Diese Faktoren sollten bei der Interpretation von Proteinmustern, die mit Coomassie-Blue visualisiert wurden, entsprechend berücksichtigt werden.

Die in Teil A und B verwendeten Gele umfassen ein pH-Intervall von 3,5 - 9,5 mit einem nahezu linear verlaufenden pH-Gradienten. Die zur Auswertung herangezogenen Banden befinden sich größtenteils im pH-Intervall 5 - 8. Die marginalen Zonen der Pherogramme sowie die an den Auftragpositionen evtl. vorhandenen Präzipitate oder Gelverletzungen lagen außerhalb des Auswertungsbereiches.

Unter qualitativen Pherogrammunterschieden ist das Fehlen bzw. das Erscheinen von neuen zusätzlichen Banden zu verstehen. Quantitative Pherogrammunterschiede sind durch Konzentrationsunterschiede einzelner Fraktionen gekennzeichnet. Sie sind entweder mit bloßem Auge als Farbintensitätsunterschiede im Pherogramm oder als Differenzen in den Flächenintegralen der einzelnen Peaks in den Densitogrammen sichtbar.

Überblick über die Abbildungen:

Abbildung 1: Pherogramme aus Rindfleischextrakten (Roastbeef, 24 h post mortem) von 7 männlichen Rindern

Abbildung 2: Densitogramme aus Rindfleischextrakten (Roastbeef, schlachtwarm) von 4 männlichen Rindern

Abbildung 3: Densitogramme aus Rindfleischextrakten (3 Lokalisationen) eines Individuums

Abbildung 4: Densitogramme aus Hausschweinefleischextrakten (5 Lokalisationen) eines Individuums

Abbildung 5: Densitogramme aus Minipigfleischextrakten (5 Lokalisationen) eines Individuums

Abbildung 6: Densitogramme aus Minipigfleischextrakten von Tieren unterschiedlichen Geschlechts

Abbildung 7: Pherogramme aus Minipigfleischextrakten (5 Lokalisationen) von 2 Individuen unterschiedlichen Geschlechts

Abbildungen: siehe Anhang

3.1.4 Beschreibung und Besprechung der Befunde

Die in Teil A angeführten Untersuchungen sind als Vorversuche für die in Teil B beschriebenen Lagerversuche zu verstehen. Für beide Teile wurde die Isoelektrofokussierung in 0,5-mm-Polyacrylamidgelen mit dem pH-Bereich 3,5 - 9,5 angewendet. Mit den Untersuchungen in Teil A sollte ermittelt werden, ob mit dieser Untersuchungstechnik interindividuelle (Abb. 1, 2, 6, 7), intraindividuelle (Abb. 3, 4, 5, 7) und geschlechtsspezifische (Abb. 6, 7) Differenzen aus tierartidentischem Fleisch nachweisbar sind. Die Abbildungen 1 - 7 (siehe Anhang) zeigen Phero- bzw. Densitogramme, die aus Rind-, Hausschweine- und Minipigfleischextrakten stammen.

Die Pherogramme bestehen aus einer Vielzahl von Proteinbanden, die ihren isoelektrischen Punkten entsprechend angeordnet sind. Die einzelnen Banden unterscheiden sich außer in ihren isoelektrischen Punkten, also ihrer Position

im Pherogramm, in ihrer Farbintensität bzw. Konzentration und ihrer Ausdehnung. Zur vergleichenden Auswertung wurden nur die stark ausgeprägten, deutlich sichtbaren Banden, die auch als Hauptbanden bezeichnet werden, herangezogen. Durch Ausmessen des pH-Gradienten mit einer Oberflächenmeßelektrode wurde ermittelt, daß der größte Teil der Hauptbanden sich im pH-Intervall 5 - 8 befand. Innerhalb dieses pH-Bereiches konzentrierten sich die stark ausgeprägten Fraktionen im pH-Bereich 6,3 - 7,2. Einige dieser Banden wurden durch das aus mehreren Fraktionen bestehende Myoglobin gebildet.

Beim Vergleich der Proteinmuster auf inter-, intra- und geschlechtsspezifische Unterschiede wurde hinsichtlich der Positionen der einzelnen Eiweißbanden eine sehr gute Übereinstimmung festgestellt. Qualitative Pherogrammdifferenzen konnten somit ausgeschlossen werden. Es traten lediglich geringfügige quantitative Abweichungen ohne systematische Variationen auf, so daß die tierartspezifischen Merkmale der Proteinmuster gar keine oder nur geringfügige und für die Bestimmung der Tierart unbedeutende Veränderungen aufwiesen.

Bei vergleichender Betrachtung der Abbildungen 1 und 2 fiel auf, daß die quantitativen Unterschiede zwischen den Individuen bei schlachtwarmem Rindfleisch wesentlich geringer als bei dem 24 Stunden gelagerten Rindfleisch waren. Die Ursache dafür ist in den nach dem Tode in der Muskulatur ablaufenden Vorgängen zu sehen, die eine Veränderung der Eiweiße, auch ihres Lösungsverhaltens, bewirken. Durch die post mortem ständig zunehmende Permeabilität der Zellwände erfolgt eine Störung von Gleichgewichten und eine Konzentrationsverschiebung des Lösungswassers (GRAU 1969).

Die quantitativen Pherogrammdifferenzen wurden von mehreren Untersuchern sowohl bei der Fokussierung als auch bei der Elektrophorese festgestellt (GILES 1962; GISSEL 1978; HOFMANN 1986; KÖNIG 1982; KOSSMANN 1969; LEE u. GRAU 1966; NAUJOK 1985). Diese Differenzen haben folgende Ursachen:

a) Unterschiede in der quantitativen Zusammensetzung der Sarkoplasmaeiweiße
b) Unterschiede in den Proteinauftragmengen

Zu a)
Die Heterogenität des Fleisches wird hervorgerufen durch die Einflüsse mehrerer Faktoren wie Erbanlagen, Alter, Trainingszustände der Versuchstiere, Ausblutungsgrade der Tierkörper und Lagerungsbedingungen des Fleisches. Die innerhalb der Tierart auftretenden intra- und inter-individuellen Konzentrationsunterschiede identischer Eiweißbanden sind somit ein Ausdruck der natürlichen Variabilität der quantitativen Zusammensetzung der Sarkoplasmaproteine. Quantitative Pherogrammdifferenzen sind deshalb zur Tierartenidentifizierung nicht heranzuziehen.

Im Vergleich zur PAGE liefert die IEF aufgrund ihres höheren Auflösungsvermögens eine detailliertere Darstellung von der Zusammensetzung der Eiweißspektren. Die IEF-Pherogramme sind, ohne Spezifitätsverlust, dadurch zwar in gewisser Weise inhomogener, aber gerade deshalb auch informationsreicher.

In den Diskussionen über die Vor- und Nachteile der IEF und der PAGE wurde der höhere Informationsgehalt der IEF-Pherogramme für die Auswertung als unerwünscht, überflüssig und störend beurteilt. Dabei blieb unberücksichtigt, daß die quantitativen Pherogrammdifferenzen lediglich eine

den technischen Möglichkeiten entsprechende Darstellung der Konzentrationsschwankungen einzelner Fraktionen sind, die auch z.B. bei der PAGE, z.B. SDS-PAGE (HOFMANN 1986), festgestellt wurden. Wenn diese Untersuchungsmethoden nicht in der Lage wären, Konzentrationsschwankungen als Intensitätsunterschiede in den Proteinmustern wiederzugeben, wären die Pherogramme zwar homogener, aber weniger informativ. Unter diesem Aspekt sollten die nicht tierartspezifischen Intensitätsschwankungen in Kauf genommen und bei der Auswertung und Beurteilung der Pherogramme entsprechend berücksichtigt werden.

Anhand vieler Pherogramme wurde ermittelt, daß die bei der IEF auftretenden quantitativen Differenzen bei konsequenter Einhaltung standardisierter Versuchsbedingungen (z.B. aufzutrennende Proteinmenge) meist sehr gering und in allen Fällen ohne Einfluß auf die Tierartspezifität waren. Entsprechend ist auch für die SDS-PAGE festgestellt worden, daß eine unterschiedliche Ausprägung der Intensität der Proteinbanden einen Rückschluß auf die vorliegende Tierart nicht zuläßt (HOFMANN 1986).

Zu b)

Pherogramme, die miteinander verglichen werden sollen, müssen unter identischen Bedingungen hergestellt werden. Dabei ist die Auftrennung gleicher Proteinmengen sowie die gleiche Ausdehnung der Proteinmuster von wesentlicher Bedeutung. Für die IEF ist die Proteinbestimmung der Extrakte in der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG vorgeschrieben.

Differierende Proteinauftragmengen können zu Fehldiagnosen führen. Wenn die Proteinmengen zu gering sind, können Banden im Pherogramm fehlen, was einem qualitativen und damit tierartspezifischen Unterschied entspräche.

Auch zu große Proteinmengen können den Eindruck eines Pherogramms erheblich beeinflussen, da die Banden und der Pherogrammhintergrund verstärkt werden. Banden mit relativ geringen Konzentrationen heben sich dann nicht mehr ausreichend vom Pherogrammhintergrund ab.
Wenn die Proteinmengen nicht normiert sind, läßt sich bei Material unbekannter Herkunft nicht abgrenzen, ob bestimmte Banden tatsächlich fehlen oder aufgrund zu geringer Auftragmengen nicht sichtbar werden.
Anhand eigener Untersuchungen wurden in den Extrakten von 40 Haus- und Wildtierarten Proteingehalte zwischen 0,8 und 2,2 % ermittelt. In einem Extrakt einer unbekannten, wahrscheinlich vorbehandelten, zur Untersuchung angelieferten Probe wurden nur 0,5 % Protein festgestellt. Aus solchen Erfahrungen läßt sich ableiten, daß die Bestimmung und Angleichung der Proteinkonzentrationen auch für die Routineuntersuchung durchaus nicht überflüssig, sondern eine Notwendigkeit zur Abgrenzung zwischen tatsächlichen und vorgetäuschten Differenzen ist.
Besondere Aufmerksamkeit wurde der Proteinbestimmung auch in einer Arbeit über die Fraktionierung, Bestimmung und Differenzierung von Proteinen, insbesondere in Fleisch und Fleischerzeugnissen gewidmet (DE WREEDE 1982). Hinsichtlich der Notwendigkeit von Proteinbestimmungen werden allerdings auch andere Einschätzungen diskutiert (KAISER u. KRAUSE 1985; NAUJOK 1985). Nach Auffassung von NAUJOK (1985) ist die Biuretmethode zeitaufwendig, teils mit Unsicherheiten behaftet und bei Anwendung von 1 mm dicken PAGIF-Platten nicht erforderlich. Bezüglich der Unsicherheiten wird angeführt, daß die Methode aufgrund der Eigenfarbe der Extrakte fehlerhafte Ergebnisse liefere, weshalb die Einführung einer Leerwertkorrektur für notwendig erachtet wurde. Dem ist entgegenzuhalten, daß es sich bei der Biuretmethode um eine erprobte und in Ringversuchen abgesicherte Methode zur Bestimmung des Proteingehaltes in Fleisch und Fleischerzeugnissen handelt, die in die Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren, § 35 LMBG 06.00/23 aufgenommen worden ist. Die erheblichen Schwankungen, die bei den von NAUJOK (1985) durchgeführten Dreifachbestimmungen auffielen, sind deshalb nicht als grundsätzliche Methodenfehler zu interpretieren.

Teil B

3.2 Einsetzbarkeit der Isoelektrofokussierung zur Tierartenidentifizierung aus gelagertem Fleisch

Die nachfolgend beschriebenen Versuche wurden durchgeführt, um Veränderungen in den Pherogrammen aus Fleischextrakten in Abhängigkeit von den Lagerungsbedingungen am Beispiel des Rindfleisches zu untersuchen.

3.2.1 Oberblick über den Versuchsablauf

Als Untersuchungsmaterial wurde Roastbeef (M. longissimus dorsi) von 4 einjährigen Rindern verwendet. Die Probenentnahme erfolgte

1) unmittelbar nach dem Schlachtungs- und Herrichtungsprozeß,
2) 24 Stunden nach der Schlachtung.

Aus den schlachtwarmen Fleischproben wurden nach der Bestimmung des pH-Wertes wäßrige Fleischextrakte hergestellt, die bis zur weiteren Untersuchung bei -80 °C gelagert wurden.

Die 24 Stunden nach der Schlachtung entnommenen Fleischproben (gekühlt auf +4 °C) wurden weitgehend von Fett und Bindegewebe befreit und in würflige Teilstücke mit einer Kantenlänge von 3 - 4 cm zerlegt.

Alle Proben wurden einzeln in Folienbeutel (s.u. 3.2.3.2) aerob bzw. vakuumverpackt und maximal bis zu 3 Monaten unter definierten Bedingungen gelagert. Als Lagerungstemperaturen wurden -18 °C, +4 °C, +10 °C und +20 °C gewählt. Die Entnahme der einzelnen Proben aus den Lagerräumen erfolgte nach festen Zeitintervallen. Unmittelbar nach

der Entnahme wurden die gelagerten Fleischproben einer pH-Wertbestimmung, einer organoleptischen Beurteilung und anschließend einem Extraktionsverfahren unterzogen. Die Fleischextrakte aus gelagertem Fleisch wurden ebenso wie die Fleischextrakte aus schlachtwarmem Fleisch bis zur weiteren Untersuchung mit der Isoelektrofokussierung bei -80 °C aufbewahrt.

Nachdem auch aus den am längsten gelagerten Fleischproben (3 Monate bei -18 °C) Fleischextrakte gewonnen worden waren, wurden alle Extrakte aus schlachtwarmem und gelagertem Fleisch aufgetaut, einer Proteinbestimmung nach der Biuretmethode unterzogen und auf 1 % Protein eingestellt.
Die auf diese Weise vorbereiteten Extrakte wurden zur Darstellung von Proteinmustern (= Pherogrammen) mit der Isoelektrofokussierung in 0,5-mm-Polyacrylamidgelen (pH-Bereich 3,5 - 9,5) eingesetzt. Zur objektiven Darstellung der Pherogramme wurde eine densitometrische Auswertung vorgenommen.

3.2.2 Untersuchungsmaterial

Für die Untersuchungen wurde Roastbeef (M. longissimus dorsi) von den unter 3.1.1 beschriebenen Rindern (schwarzbunt, ♂, ca. 12 Monate alt, ca. 400 kg schwer) verwendet.

3.2.3 Methoden

3.2.3.1 Bearbeitung des schlachtwarmen Fleisches

- Probenentnahme, pH-Wertmessung, Probenaufbereitung, Fleischextraktlagerung -

Aus jedem schlachtwarmen Tierkörper wurden jeweils 2 Parallelproben aus dem M. longissimus dorsi entnommen. Nach der Bestimmung des pH-Wertes (pH-Meßgerät: Fa. Knick, Einstichelektrode: Fa. Ingold) wurde die Herstellung und Lagerung der Fleischextrakte sowie deren Vorbereitung für den Einsatz zur Fokussierung, wie unter 3.1.2.2 beschrieben, durchgeführt.

3.2.3.2 Bearbeitung des 24 Stunden gelagerten Fleisches

- Probenentnahme, pH-Wertmessung, Probenverpakkung -

Aus den auf +4 °C gekühlten Tierkörperhälften wurde das Roastbeef jeweils in einem Stück entnommen und an mehreren Stellen der pH-Wert gemessen.

Um eine ausreichende Anzahl von Proben für die anschließenden Lagerversuche zu erhalten, wurde das Roastbeef nach bestmöglicher Entfernung von Fett und Bindegewebe in würflige Teilstücke mit einer Kantenlänge von 3 - 4 cm zerlegt. Die Hälfte der Fleischproben wurde einzeln in Haushaltsgefrierbeuteln mit lockerem Clipverschluß aerob verpackt. Die restlichen 50 % wurden ebenfalls einzeln verpackt. Dafür wurden Walovac-Folienbeutel (Fa. Wolff) mit einer Gasdurchlässigkeit von < 60 [$cm^3/m^2 \cdot d \cdot bar$ bei 20 °C, 0 % rel. F.] verwendet. Die Verpackung der anaerob zu lagernden Proben wurde mit einer Vakuumverpakkungsmaschine (Fa. Krämer und Grewel, Type: AVQ) durchgeführt.

3.2.3.3 Lagerung der Fleischproben

Unmittelbar nach dem Verpacken wurden sowohl die aerob als auch die vakuumverpackten Fleischproben den vorgesehenen Lagerbedingungen entsprechend in eine Gefriertruhe (Fa. Linde) bei -18 °C, in zwei Kühlschränke (Fa. Linde) bei +4 °C bzw. +10 bis +12 °C und in einem Temperaturschrank (Fa. Memmert) bei +20 bis +22 °C eingelagert und dort bis zu den Untersuchungsterminen belassen.

Die zur Lagerung des Fleisches benutzten Geräte wurden vor Beginn des Experimentes einer einwöchigen Überprüfung hinsichtlich ihrer Temperaturkonstanz unterzogen. Dabei wurden keine bzw. nur sehr geringe Abweichungen (± 0,5 °C) von der vorgewählten Temperatur festgestellt.

3.2.3.4 Lagerungsbedingungen für aerob und vakuumverpackte Fleischproben

Temperatur in °C	relative Feuchte in %	Zeitintervalle für die Probenentnahme
-18		1 Monat
+ 4	nicht < 80	1 Woche
+10 bis +12	nicht < 60	4 Tage
+20 bis +22	nicht < 60	2 Tage

Tabelle 2

Nach den in Tabelle 2 angegebenen Zeitintervallen wurden sowohl vom aerob als auch von dem vakuumverpackten Fleisch für jeden Temperaturbereich Parallelproben ent-

nommen und sofort untersucht und aufbereitet. Die Dauer der Lagerung betrug bei den Lagertemperaturen +4 °C, +10 bis +12 °C und +20 bis +22 °C maximal 28 Tage. Die tiefgefrorenen (-18 °C) Proben wurden bis zu 3 Monaten gelagert.

3.2.3.5 Untersuchung gelagerter Fleischproben
- organoleptisch, pH-Wert -

Die einzelnen Fleischproben wurden unmittelbar nach Ablauf der vorgesehenen Lagerdauer einer organoleptischen Beurteilung, einer pH-Wertmessung und der Extraktion der wasserlöslichen Proteine unterzogen. Die organoleptische Beurteilung wurde nach folgendem groben Raster durchgeführt:

1 = keine Beeinträchtigung der Beschaffenheit
2 = säuerlich, aber keine Beeinträchtigung der Verkehrsfähigkeit
3 = nicht mehr verkehrsfähig

Vor der pH-Wertmessung wurde die zum Teil mit Bakterienkulturen und Schimmel behaftete Oberfläche der Fleischproben entfernt. Die Messung des pH-Wertes wurde etwa in der Mitte der Proben mit einer Einstichelektrode (Fa. Ingold) durchgeführt.

3.2.3.6 Aufbereitung gelagerter Fleischproben
- Extraktherstellung, Extraktlagerung, Vorbereitung der Extrakte für den Einsatz zur Fokussierung

Die Aufbereitung der gelagerten Fleischproben erfolgte analog zu schlachtwarmem oder 24 Stunden gelagertem Fleisch (siehe 3.1.2.2).

3.2.3.7 Durchführung der Isoelektrofokussierung in 0,5-mm-Polyacrylamidfertiggelen

Die Untersuchung der Extrakte aus schlachtwarmem und gelagertem Fleisch wurde mit der in der 'Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG' 06.00/17 angegebenen Methode der Isoelektrofokussierung durchgeführt (vgl. 3.1.2.3). Diese Methode wurde in Anlehnung an die den Ampholine PAGplates (Fa. LKB) beiliegende Gebrauchsanweisung erarbeitet.

3.2.4 Ergebnisse

3.2.4.1 Organoleptische Untersuchungsergebnisse

Die organoleptische Untersuchung der gelagerten Fleischproben beschränkte sich auf visuell und olfaktorisch wahrnehmbare Veränderungen des Untersuchungsmaterials. Da die Zerlegung und Verpackung des Fleisches nicht unter sterilen, sondern praxisüblichen Bedingungen erfolgte, war mit entsprechender mikrobieller Kontamination zu rechnen. Hinsichtlich der Beeinträchtigung der Fleischbeschaffenheit während der Lagerdauer mußte berücksichtigt werden, daß die Proben mit 3 - 4 cm Kantenlänge eine relativ große Ober- und Angriffsfläche für Mikroorganismen boten. Die organoleptische Beurteilung wurde nach dem unter 3.2.3.5 angegebenen Raster durchgeführt.

Alle bei -18 °C gelagerten Proben wiesen, auch nach maximaler Lagerdauer, keine Beeinträchtigung der Beschaffenheit auf. Bei dem bei +4 °C gelagerten Fleisch wurde ab der 3. Woche aufgrund der Milchsäurebildung ein leicht säuerlicher Geruch festgestellt. Eine Beeinträchtigung der Verkehrsfähigkeit resultierte daraus allerdings nicht. Das bei +10 °C und +20 °C gelagerte Untersuchungsmaterial veränderte während der Lagerung seine Farbe von rot-braun

nach grau bis grau-grün. Bei aerober Lagerung war die Fleischoberfläche anfangs stumpf, später feucht-schmierig. Bei den +10 °C-Lagerproben dominierte vom 12. Tag an muffig-dumpfer Geruch, der mit zunehmender Lagerdauer immer mehr fäulnisartig wurde.

Bei den vakuumverpackten Proben, deren Oberfläche von einem milchig-trübigen Flüssigkeitsfilm bedeckt war, überwog der auf die in diesem Milieu produzierte Milchsäure zurückzuführende saure Geruch.

Das bei +20 °C gelagerte Untersuchungsmaterial wurde am 4. Lagertag, das bei +10 °C gelagerte Fleisch am 8. Lagertag als nicht verkehrsfähig beurteilt.

3.2.4.2 pH-Werte

Der pH-Wert des Rindfleisches veränderte sich erwartungsgemäß in Abhängigkeit von der Art und der Dauer der Lagerung. Er lag im schlachtwarmen Fleisch zwischen 6,11 und 6,93 und war nach 24 Stunden auf 5,43 und 5,94 abgefallen.

Bei der +10 °C-Lagerung ohne Vakuumverpackung stieg vom 16. Lagertag an der pH-Wert und erreichte am 28. Lagertag einen Wert von 7,31. Das unter Luftabschluß gelagerte Fleisch wies unter gleichen Temperaturbedingungen eine leicht fallende Tendenz des pH-Wertes auf (pH 5,08 am 28. Tag). Einen ähnlichen Verlauf zeigten auch die anaerob gelagerten +20 °C-Proben. Bei der -18 °C- und der +4 °C-Lagerung traten keine wesentlichen pH-Wertänderungen ein.

3.2.4.3 Pherogramme und Densitogramme

Zur Darstellung und Auswertung der Pherogramme siehe 3.1.3. Die Abbildungen der Phero- und Densitogramme befinden sich im Anhang.

Tabelle 3: Überblick über die Pherogrammveränderungen in Abhängigkeit von den Lagerungsbedingungen

Abb.-Nr.	Lagerungsbedingungen	Pherogrammveränderungen
1a	-18 °C, A, bis zu 3 Monaten	keine
2a	-18 °C, B, bis zu 3 Monaten	keine
3a	+4 °C, A, bis zu 4 Wochen	keine
4a	+4 °C, B, bis zu 4 Wochen	keine
5a	+10 °C, A, bis zu 4 Wochen	ab 16. Lagertag
6a	+10 °C, B, bis zu 4 Wochen	ab 12. Lagertag
7a	+10 °C, A, B bis zu 4 Wochen	ab 16. Lagertag bzw. ab 12. Lagertag
8a	+20 °C, A, bis zu 10 Tagen	ab 4. Lagertag
9a	+20 °C, B, bis zu 10 Tagen	ab 4. Lagertag

A = vakuumverpackt

B = aerob verpackt

Tabelle 4: Überblick über organoleptische Befunde, Pherogramm- und pH-Wertänderungen in Abhängigkeit von den Lagerungsbedingungen

Lagerungsbedingungen	organoleptische Beurteilung	Pherogrammveränderungen	pH-Wert
-18 °C, A			
1 Monat	1	---	5,87
2 Monate	1	---	5,42
3 Monate	1	---	5,40
-18 °C, B			
1 Monat	1	---	5,65
2 Monate	1	---	5,45
3 Monate	1	---	5,42
+4 °C, A			
1 Woche	1	---	5,56
2 Wochen	1	---	5,57
3 Wochen	2	---	5,50
4 Wochen	2	---	5,29
+4 °C, B			
1 Woche	1	---	5,60
2 Wochen	1	---	5,51
3 Wochen	2	---	5,48
4 Wochen	2	---	5,37
+10 °C, A			
4 Tage	1	---	5,54
8 Tage	2	---	5,48
12 Tage	3	---	5,45
16 Tage	3	x	5,47
20 Tage	3	x	5,37
24 Tage	3	x	5,33
28 Tage	3	x	5,08
+10 °C, B			
4 Tage	1	---	5,50
8 Tage	2	---	5,50
12 Tage	3	x	5,57
16 Tage	3	x	5,81
20 Tage	3	x	5,78
24 Tage	3	x	6,12
28 Tage	3	x	7,31
+20 °C, A			
2 Tage	2	---	5,41
4 Tage	3	x	5,43
6 Tage	3	x	5,34
8 Tage	3	x	5,26
10 Tage	3	x	5,44
12 Tage	3	x	5,53
14 Tage	3	x	5,39
16 Tage	3	x	5,25
18 Tage	3	x	5,41
20 Tage	3	x	5,24
22 Tage	3	x	5,19
24 Tage	3	x	5,05
26 Tage	3	x	5,11
28 Tage	3	x	5,14
+20 °C, B			
2 Tage	2	---	5,43
4 Tage	3	x	5,45
6 Tage	3	x	5,53
8 Tage	3	x	5,57
10 Tage	3	x	5,67
12 Tage	3	x	5,74
14 Tage	3	x	5,69
16 Tage	3	x	6,25
18 Tage	3	x	6,55
20 Tage	3	x	6,70
22 Tage	3	x	6,99
24 Tage	3	x	7,21
26 Tage	3	x	8,02
28 Tage	3	x	8,23

A = vakuumverpackt; B = aerob verpackt
1 = keine Beeinträchtigung der Beschaffenheit
2 = säuerlich, aber keine Beeinträchtigung der Verkehrsfähigkeit
3 = nicht mehr verkehrsfähig
--- = keine Pherogrammveränderungen
x = Pherogrammveränderungen feststellbar

3.2.5 Beschreibung und Besprechung der Befunde

In der Tabelle 4 sind die Untersuchungsergebnisse zusammengefaßt, anhand deren die Einsetzbarkeit der Isoelektrofokussierung zur Tierartenidentifizierung bei Fleisch in Abhängigkeit von der unter verschiedenen Bedingungen durchgeführten Lagerung diskutiert werden soll.

Die in Tabelle 3 angegebenen Ergebnisse resultieren aus der Untersuchung des Fleisches eines Versuchstieres. Sie dienen als repräsentative Beispiele für die Ergebnisse, die aus dem Fleisch der übrigen Versuchstiere erarbeitet wurden. Hinsichtlich der in Abhängigkeit von den Lagerungsbedingungen auftretenden Pherogrammveränderungen und der organoleptischen Beurteilung wurden keine und bezüglich des pH-Wertes nur sehr geringfügige individuelle Differenzen beobachtet.

Bei diesen Untersuchungen kam es nicht darauf an, Proteinfraktionen zu identifizieren, sondern Art, Umfang und Zeitpunkt der Pherogrammabweichungen in Beziehung zu organoleptischen Veränderungen aufzuzeigen.

Die Auswertung der Pherogramme wurde wie unter 3.1.3 beschrieben vorgenommen. Die Abbildungen 1a bis 9a befinden sich im Anhang. Die Pherogramme wurden auf einer Gelplatte so angeordnet, daß ein direkter Vergleich von schlachtwarmem, 24 Stunden und länger gelagertem Fleisch möglich war.

Im Zusammenhang mit lagerungsbedingten Veränderungen der tierartspezifischen Proteinmuster wurden nur qualitative Differenzen berücksichtigt. Das Auftreten, die Ursache und Bedeutung quantitativer Pherogrammveränderungen wurden bereits unter 3.1.4 diskutiert.

Zur Beurteilung der Tierartspezifität von Proteinmustern von gelagertem Fleisch wurden in erster Linie die Positionen der einzelnen Banden und das Fehlen bzw. Erscheinen von bisher nicht vorhandenen Banden herangezogen.

Die Proteinkonzentrationen der einzelnen Fraktionen waren als Kriterien für lagerungsbedingte Pherogrammveränderungen nicht zu verwerten, weil bereits im frischen Fleisch inter- und intraindividuelle Konzentrationsschwankungen auftraten.

Beim Vergleich von schlachtwarmem und 24 Stunden bei +4 °C gelagertem Fleisch waren keine qualitativen Unterschiede erkennbar. Auch bei dem bis zu 3 Monaten bei -18 °C bzw. bis zu 4 Wochen bei +4 °C gelagerten Untersuchungsmaterial wurden weder Beeinträchtigungen der Verkehrsfähigkeit noch Veränderungen der Proteinmuster festgestellt. Die bei +10 °C oder bei +20 °C gelagerten Fleischproben wiesen allerdings im Laufe der Lagerung gravierende Pherogrammveränderungen auf.

Sowohl die vakuumverpackten als auch die aerob verpackten Fleischproben wurden nach 12tägiger Lagerung bei +10 °C als nicht mehr verkehrsfähig beurteilt. Pherogrammveränderungen traten bei den Fleischproben aus den Vakuumpakkungen am 16. Lagertag, bei den in Haushaltsgefrierbeuteln ohne Luftabschluß verpackten Proben bereits am 12. Lagertag auf.

Alle bei +20 °C gelagerten Untersuchungsmaterialien waren am 4. Lagertag verdorben und zeigten deutliche Abweichungen von dem tierartspezifischen Proteinmuster.

Bei dem organoleptisch feststellbaren beginnenden Verderb des Fleisches waren die pH-Werte nicht auffallend erhöht,

stiegen aber bei den aerob verpackten Proben mit zunehmender Lagerdauer allmählich an.

Von den Veränderungen des für Rindfleisch charakteritischen isoelektrischen Spektrums waren unabhängig von der Lagertemperatur bei allen untersuchten Fleischproben die gleichen Proteinbanden betroffen. Diese Fraktionen entsprechen z.B. in Abb. 5a (+10 °C, vakuumverpackt) den Peaks mit den Retentionszeiten 1,75 / 2,29 / 2,83 / 3,18. Art und Umfang der Pherogrammveränderungen verliefen bei den +20 °C-Lagerproben analog zur +10 °C-Lagerung.

Bezüglich der unterschiedlichen Retentionszeiten identischer Banden in unterschiedlichen Abbildungen wird auf 3.1.3 (Darstellung der Ergebnisse) verwiesen.

Fleischproben, die nach dem unter 3.2.3.5 angegebenen Schema für die organoleptische Beurteilung mit "2" eingestuft wurden, zeigten keine Veränderungen im Proteinmuster. Als Beispiel für diese Feststellung kann das 3 bzw. 4 Wochen bei +4 °C oder das 8 Tage bei +10 °C gelagerte Fleisch angeführt werden.

Bei allen gelagerten Fleischproben traten die Pherogrammänderungen immer erst dann auf, wenn das Fleisch aufgrund sinnfälligen Verderbs nicht mehr verkehrsfähig war. Der Verderb des Fleisches im Anfangsstadium führte nicht zu Veränderungen des Proteinmusters. Anhand der Pherogramme ist ablesbar, daß die verschiedenen Proteinfraktionen während der Lagerung in unterschiedlichem Ausmaß verändert wurden. Nach LAWRIE (1970) verhalten sich z.B. die sarkoplasmatischen Proteine während der Fleischreifung und der parallel dazu ablaufenden mikrobiologischen Vorgänge labiler als die myofibrillären Eiweiße.

Die Pherogrammveränderungen, die sich mit zunehmender Lagerdauer im Verschwinden und/oder Neuauftreten von Banden darstellen, sind auf den mikrobiologisch bedingten Proteinabbau und auf die veränderte Extrahierbarkeit der Eiweiße zurückzuführen. Auch die von KAFFEHR (1962) beobachtete Zunahme kurzkettiger Polypeptide während der Reifung spielen in diesem Zusammenhang möglicherweise eine Rolle.

Die graduelle Abnahme und Abwandlung verschiedener Eiweißkomponenten wurden von mehreren Autorengruppen (ABERLE u. MERKEL 1966; FUJIMAKI u. DEATHERAGE 1964; KRONMANN u. WINTERBOTTOM 1960; RAMPTON et al. 1965) anhand unterschiedlicher Untersuchungsmethoden festgestellt.

Beim Vergleich der Pherogramme aus völlig verdorbenem Fleisch fiel auf, daß sich zumindest drei bzw. vier identische Fraktionen unabhängig von der Lagertemperatur durch besondere Resistenz auszeichneten. Diese Fraktionen waren in ihrer Intensität entweder gar nicht oder nur wenig reduziert, z.T. aber auch verstärkt.

Mit dem Verderb des Fleisches veränderten sich die ursprünglich tierartspezifischen Pherogramme nicht nur durch den Verlust, sondern auch durch das Auftreten vieler neuer, sehr feiner, unscharfer Banden, die den Pherogrammen, abgesehen von den wenigen noch vorhandenen, scharf abgegrenzten Fraktionen, ein diffuses Aussehen vermittelten. Es wurde beobachtet, daß das Auftreten der neuen Banden in demselben pH-Bereich wie das Verschwinden der Hauptfraktionen stattfand. Aus diesem Grunde lag die Schlußfolgerung nahe, daß es sich bei den sehr feinen neu aufgetretenen Banden um polypeptidartige Abbauprodukte ehemaliger Hauptbanden handelt. In den densitometrischen Darstellungen der Proteinmuster erschienen diese

neuen schwach ausgeprägten Banden nur dann, wenn ihre Intensität größer war als die des Pherogrammhintergrundes, der durch entsprechende Einstellung des Densitometers eliminiert wurde.

Die Lagerungszeiten bis zum sinnfälligen Verderb des Fleisches und dem Auftreten von Pherogrammveränderungen waren erwartungsgemäß in erster Linie von der Lagerungstemperatur, aber auch von der Art der Verpackung abhängig.

Bei den aerob verpackten +10 °C-Lagerproben traten nach 12 Lagertagen mit dem organoleptisch feststellbaren Verderb des Fleisches auch Pherogrammveränderungen auf. Die vakuumverpackten +10 °C-Proben wurden am 12. Lagertag zwar auch als nicht mehr verkehrsfähig beurteilt, zeigten aber zu diesem Zeitpunkt noch keine Veränderungen im tierartspezifischen isoelektrischen Proteinspektrum. Offensichtlich wurde der Proteinabbau durch das in den Vakuumpackungen vorherrschende Mikromilieu verzögert.

Sowohl die aerob als auch die vakuumverpackten Proben wiesen nach 2tägiger Lagerung bei +20 °C Geruchs-, aber keine Pherogrammveränderungen auf. Nach einer Lagerzeit von 4 Tagen bei +20 °C waren die Proben als nicht mehr verkehrsfähig zu bezeichnen. Zu diesem Zeitpunkt waren auch bereits deutliche Abweichungen von den isoelektrischen Referenzspektren des frischen, verkehrsfähigen Rindfleisches festzustellen.

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse führen zu dem Resultat, daß die Pherogramme aus gelagertem Fleisch mit zunehmenden Verderbniserscheinungen Abweichungen von tierartidentischen Referenzpherogrammen aufweisen und somit ihre Spezifität verlieren. Daraus ist zu folgern,

daß die Fokussierung sich in der in dieser Arbeit angewendeten Art und Weise für die Tierartenidentifizierung aus Fleisch mit sehr deutlichen Verderbniserscheinungen nicht eignet. Die Schwierigkeit liegt dabei allerdings nicht im Vorgang der Fokussierung, sondern in der Auswertung der Pherogramme aus mehr oder weniger verdorbenem Fleisch. Zu diesem Zweck müßten Referenzextrakte aus tierartidentischem Fleisch verschiedener Verderbnisstadien zur Verfügung stehen, wobei vorab zu untersuchen wäre, inwieweit die im Laufe der Lagerung entstehenden reduzierten Proteinmuster noch tierartspezifische Merkmale aufweisen und inwieweit vor allen Dingen bei jeder Art des mikrobiellen Verderbs immer mit dem Auftreten des gleichen Musters von Abbauprodukten gerechnet werden kann.

Teil C

Der Teil C wurde in der Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 98, (4), 130 - 135 (1985) veröffentlicht.

3.3 Tierartendifferenzierung aus hitzebehandeltem Fleisch mittels Isoelektrofokussierung und anschließender Silberfärbung

3.3.1 Einführung in die Thematik

Zum Nachweis der Tierart aus über 60 °C erhitztem Fleisch erwies sich die Fokussierung in Kombination mit der Gesamtproteinanfärbung durch Coomassie-Blue aufgrund der geringen Konzentration gelöster Proteine als nicht ausreichend geeignet. Um die Isoelektrofokussierung als Eiweißtrennmethode zur Tierartendifferenzierung anwenden zu können, wurde in Anlehnung an Untersuchungen auf serologischem Gebiet (SINELL 1968a u. b; SINELL u. MENTZ 1969) der Versuch einer effektiveren Extraktion der sarkoplasmatischen Proteine mit Harnstofflösung unternommen. Dieses Verfahren sowie die Konzentrationserhöhung des Proteins im Extrakt durch Lyophilisieren und anschließendes Resuspendieren mit einer geringeren Wassermenge führte zwar zu einer geringfügigen, aber längst nicht ausreichenden Verbesserung der Proteinspektren.

KING (1984) publizierte die Tierartenbestimmung aus maximal bis auf 120 °C erhitztem Fleisch mittels Isoelektrofokussierung und Enzymfärbung. Die Speziesidentifizierung mit serologischen Methoden aus ebenfalls bis auf 120 °C erhitztem Fleisch wurde von SINELL u. MENTZ (1969) beschrieben.

Da mit der Fokussierung in Kombination mit der Coomassie-Blue-Färbung ein gleichwertiges Ergebnis nicht erzielt werden konnte, war zu vermuten, daß die Konzentration der nach der Erhitzung verbleibenden Proteine zu gering ist, um mit dieser Färbetechnik nachgewiesen zu werden. Deshalb wurde die sehr sensible Silberfärbung anstelle der wesentlich unempfindlicheren Coomassie-Blue-Färbung angewendet. Mit dieser Technik ist es möglich, aus Fleischkonserven spezifische Proteinmuster darzustellen.

Die hier referierten Versuche sollen demonstrieren, daß den Problemen bei der Tierartendifferenzierung aus erhitztem Fleisch nicht nur durch Variation und Optimierung der Extraktions- und Konzentrierungsverfahren, sondern auch durch empfindlichere Nachweismethoden begegnet werden kann.

3.3.2 Material und Methoden

3.3.2.1 Geräte

a) zur Konservenherstellung:

Fleischwolf (Lochscheibe 4 mm)
Dosenverschließmaschine
Rotationsautoklav

---

1) F_c-Wert = F-Wert der gesamten letalen Hitze, die im geometrischen Mittelpunkt des Füllgutes während der Hitzebehandlung einwirkt.

F-Wert = Maßzahl für die Hitzebehandlung, die ein Lebensmittel erfahren hat und aus der eine bestimmte Haltbarkeit des Produktes resultiert.

b) zur Extraktherstellung:

Homogenisator (Sorvall-Omnimixer, Fa. Dupont)
Zentrifuge mit Kühlvorrichtung (Zentrifugalbeschleunigung : mindestens 2 000 g)
Faltenfilter, Nr. 595^{1}/2 (Schleicher & Schüll)
Millipore-Sterilfilter, 0,45 µm und 0,22 µm
Lyophilisationsanlage (GT 6, Fa. Leybold-Heraeus)

c) zur Ultradünnschichtfokussierung:

Elektrofokussierausrüstung (Fa. LKB), bestehend aus Fokussierkammer, Stromversorgungsgerät und Umlaufkryostat
Applikatorstreifen, 3 x 2 mm/Applikatorschlitz (Fa. Serva)
Filmtrocknungsgerät
Laser-Densitometer (Fa. LKB)

3.3.2.2 Chemikalien

a) zur Ultradünnschichtfokussierung:

Polyacrylamidgel-Fertigplatten (Fa. Serva):
- 5 % T, 3 % C
- 0,1 x 125 x 125 mm
- pH-Bereiche: 3 - 10; 5 - 8;

n-Decan
Anodenflüssigkeit: 3,3 g Asparaginsäure und 3,7 g Glutaminsäure in 1 l destilliertem Wasser
Kathodenflüssigkeit: 4,0 g Arginin-Base, 0,6 g Lysin-Base und 120 g Ethylendiamin auf 1 l destilliertes Wasser

b) zur Fixierung und Färbung:

Fixierlösung: 20 %ige Trichloressigsäure
0,01 %ige Kaliumpermanganatlösung

10 %igen Ethylalkohol
0,5 %ige Silbernitratlösung

Entwicklerlösung: 2 %ige Natriumcarbonatlösung mit
0,2 % Formaldehyd
10 %ige Essigsäure (zum Stoppen der
Entwicklung)

3.3.2.3 Untersuchungsmaterial

Hitzebehandeltes Rind-, Schweine-, Schaf- und Känguruhfleisch:

- 80 °C Kerntemperatur
- F_c = 0,5 (110 °C Kerntemperatur)
- F_c = 5,9 (121 °C Kerntemperatur)
- F_c = 15,5 (121 °C Kerntemperatur)

Hitzebehandelte (80 °C Kerntemperatur; F_c = 0,5) Rind-Schweinefleischmischungen (50 : 50 Gew.%).

Um für die Untersuchungen Material mit bekannten F-Werten zur Verfügung zu haben, wurden die benötigten Fleischkonserven selbst hergestellt. Die Wahl der anzuwendenden F-Werte erfolgte nach der mikrobiologischen Einteilung von Fleischkonserven nach LEISTNER (1979). Das zur Konservenherstellung verwendete Fleisch wurde weder mit Salz oder Gewürzen noch mit anderen Zusätzen versehen, so daß eine aufwendige Aufbereitung der Extrakte zur Eliminierung dieser zum Teil störenden Faktoren nicht erforderlich war.

3.3.2.4 Konservenherstellung

Fett- und bindegewebsarmes Rind-, Schweine-, Schaf- und Känguruhfleisch mit einem Fleischwolf (Lochscheibe 4 mm) zerkleinern, jeweils 100 g Frischfleisch (nach Tierarten bzw. Fleischmischungen) in lackierte Weißblechdosen (DIN 14) füllen, Dosen nach Verschließen auf 80 °C Kerntemperatur bzw. in einem Rotationsautoklaven mit F_c = 0,5; F_c = 5,9; F_c = 15,5 erhitzen.

3.3.2.5 Extraktherstellung

10 - 20 g hitzesterilisiertes Fleisch mit einem Messer zerkleinern, mit destilliertem Wasser (1 Teil Fleisch + 2 Teile Wasser) 1 Minute bei 16.000 U/min mit einem Sorvall-Omnimixer homogenisieren. Das Homogenisat mit einer Kühlzentrifuge 15 Minuten bei -10 °C bei 2.000 g zentrifugieren. Den Überstand durch Faltenfilter und Millipore-Filter (0,45 µm und 0,22 µm) filtrieren, Filtrat in 1 ml-Portionen abfüllen und lyophilisieren. Lyophilisierte Extraktportion mit maximal 200 µl destilliertem Wasser resuspendieren und zur Fokussierung einsetzen.

3.3.2.6 Ultradünnschichtfokussierung (UDIEF)

Oberfläche des in der Fokussierkammer befindlichen Kühlblocks mit etwas n-Decan befeuchten, Fertiggelplatte luftblasenfrei auf den auf 6 - 8 °C temperierten Kühlblock auflegen, Schutzfolie vom Gel abziehen, die mit den entsprechenden Elektrodenlösungen getränkten Elektrodendochte auf die seitlichen Ränder und den Applikatorstreifen 2,5 cm vom anodischen Rand entfernt auf das Gel auflegen. Pro Applikatorschlitz 5 µl aufgelöstes Extrakt-

lyophilisat auf das Gel auftragen. Stromversorgungsgerät auf folgende Maximalwerte einstellen: 1.700 V; 4,5 mA; 5 Watt; Fokussierkammer an das Netzgerät anschließen; 120 Minuten fokussieren. Nach Abschalten des Stromversorgungsgerätes Gelplatte sofort aus der Fokussierkammer entnehmen, die seitlichen Ränder des Gels mit den daraufliegenden Elektrodenstreifen abschneiden und das Gel mindestens 5 Minuten in 20 %iger Trichloressigsäure fixieren.

3.3.2.7 Silberfärbung

Abgesehen von geringfügigen Modifikationen hinsichtlich Reaktions- bzw. Einwirkzeiten und Zusätzen zur Silbernitratlösung handelt es sich um die vereinfachte Silberfärbung nach KINZHOFER et al. (1983). Die Lösungen werden mit dem eingelegten Gel während der einzelnen Reaktionsschritte von Hand bewegt.

Schema zur Durchführung der Silberfärbung:

Schritt	Lösung	Dauer
1	Kaliumpermanganat 0,01 %	10 - 15 sec
2	Ethylalkohol 10 %	2 x 15 sec
3	Silbernitratlösung 0,5 %	3 min
4	Entwicklerlösung: 2 % Na_2CO_3 mit 0,2 % HCHO	unter Sichtkontrolle bis zu 1 min
5	Essigsäure 10 %	1 min
6	dest. H_2O	3 x 30 sec

Die Gele werden nach dem Trocknen bei 60 °C in einem Filmtrocknungsgerät in Klarsichthüllen aufbewahrt. Permanente Lichteinwirkung auf gefärbte Gele ist zu vermeiden.

3.3.3 Auswertung und Besprechung der Befunde

Die Auswertung erfolgte durch Vergleich von Pherogrammen sowohl ohne als auch mit technischen Hilfsmitteln (Laser-Densitometer).

Die Tierartendifferenzierung aus hitzebehandeltem Fleisch basiert darauf, daß durch die Hitzebehandlung nicht alle sarkoplasmatischen Proteinfraktionen vollständig zerstört werden. Die Konzentration der verbleibenden Anteile ist allerdings so gering, daß ihr Nachweis mit den bisher üblichen Anfärbemethoden Schwierigkeiten bereitet. Um dieses Problem zu lösen, boten sich folgende technische Möglichkeiten an:

1. Erhöhung der Proteinkonzentration im Extrakt durch
   a) effektivere Extraktion durch Harnstofflösung
   b) Lyophilisation der Extrakte

2. Anwendung empfindlicherer Nachweismethoden
   a) Silberfärbung

Harnstoff bewirkt eine Degradation reversibel gebildeter Proteinaggregate und führt auf diese Weise zu einer effektiveren Extraktion des erhitzten Fleisches. Durch Lyophilisieren und anschließendes Resuspendieren der Extrakte mit Wasser (maximal 1/5 der ursprünglichen Extraktmenge) wurde eine 5- bis 10fache Konzentrationserhöhung erreicht. Mit der Harnstoffextraktion und der Lyophilisation der Extrakte lassen sich zwar verbesserte, aber für die Dif-

ferenzierung von hitzesterilisiertem Fleisch doch nicht ausreichende Ergebnisse erzielen.

Erst durch die Anwendung der Silberfärbung konnte eine entscheidende Verbesserung herbeigeführt werden. Die Methode basiert auf der Anfärbung von Proteinfraktionen durch Silberionen. Die praktische Durchführung der Silberfärbung war bis vor einigen Jahren mit erheblichen Problemen behaftet und die Ergebnisse demzufolge häufig unzureichend. Mehrere Arbeitsgruppen befaßten sich damit, die Silberfärbung für einen breiten Anwendungsbereich praktikabler zu gestalten (ALLEN 1982; BERSON 1983; DION u. POMENTI 1983; ESCHENBRUCH u. BÜRK 1982; FRIEDMANN 1982; MERRIL et al. 1984; MORRISSEY 1981; OAKLEY et al. 1980; POEHLING u. NEUHOFF 1981; SAMMONS et al. 1981; SWITZER et al. 1979). Die Autorengruppen HEUKESHOVEN u. DERNICK (1983) und KINZHOFER et al. (1983) publizierten vereinfachte Silberfärbungen, die vor der Durchführung der vorliegenden Arbeit an mehreren Gelen getestet wurden. Da beide zu guten Ergebnissen führten, wurde die Methode gewählt, die eine besonders schnelle Durchführung ermöglicht.

Die Vorgänge bei der Sichtbarmachung von Proteinbanden mittels Silberfärbung werden von HEUKESHOVEN u. DERNICK (1983) wie folgt dargestellt:
"Der Mechanismus der Anfärbung von Proteinbanden in Gelen durch Silber ist in gewisser Weise vergleichbar mit dem photographischen Prozeß auf lichtempfindlichen Silberhalogenschichten. Während auf dem Film das latente Bild in der mit Silberhalogeniden versetzten Gelatineschicht durch die Einwirkung von Licht entsteht, läuft in den mit Silberionen getränkten Polyacrylamidgelen an den Proteinmolekülen eine Reaktion ab, die zu Silberkeimen führt, die ein latentes Bild der Proteinbanden darstellen. Die-

se Keimbildung erfolgt durch Reduktion der an das Protein komplexgebundenen Silberionen. Dabei sind die funktionellen Gruppen der Aminosäuren und auch die Peptidbindung beteiligt. Gleichzeitig fungieren diese Gruppen wahrscheinlich auch als Reduktionsmittel für die Silberionen. Die Entwicklung bei der Silberfärbung verläuft dann analog zum fotographischen Prozeß. Die Silberionen werden - durch die Latentbildkeime katalysiert - zu Silber reduziert. Der Reduktion vorgelagert ist offenbar ein Prozeß mit hoher Aktivierungsenergie (Bildung einer neuen Phase), die durch den Latentkeim erniedrigt wird. Die Silberionen im Gel, die sich in der Nähe der Keime befinden oder durch Diffusion dorthin gelangen, können reduziert werden und erzeugen auf diese Weise ein Bild der Proteinbande."

Die Nachweisgrenze der Silberfärbung liegt auf einer Trennstrecke von 3 cm bei 0,1 - 0,2 ng Protein/mm^2. Damit ist die Silberfärbung 50- bis 100mal empfindlicher als konventionelle Färbetechniken (KINZHOFER et al. 1983). Die Abbildungen 1 - 3 zeigen Proteinspektren, die aus Extrakten von hitzebehandeltem Fleisch stammen. Diese Pherogramme bestehen im Vergleich zu Proteinmustern nativer Fleischproben aus einer wesentlich geringeren Anzahl von Fraktionen. Die einzelnen Banden sind entsprechend ihrer Konzentration mehr oder weniger gut ausgeprägt.

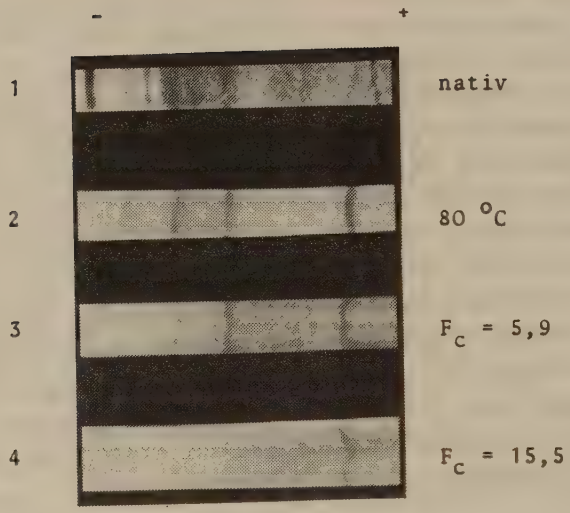

Abb. 1: UDIEF, pH-Bereich 5-8
Pherogramme aus nativem und hitzebehandeltem Fleisch

Zu Abb. 1:

Auf einem Gel (pH-Bereich 5-8) wurden Trennungen von Extrakten aus nativem, auf 80 °C-erhitztem und autoklaviertem (F_c = 5,9; F_c = 15,5) Schaffleisch durchgeführt. Der Extrakt aus nativem Fleisch wurde in 50facher, der aus 80 °C-erhitztem Fleisch in 10facher Verdünnung auf das Gel aufgetragen. Auf diese Weise wurden die Extrakte aus nativem und relativ wenig denaturiertem Material (80 °C) in ihrer Proteinkonzentration den Extrakten aus Konservenfleisch mit hohen F_c-Werten angenähert. Erwartungsgemäß reduziert sich die Anzahl und Intensität der Fraktionen durch thermische Belastung.

Die Pherogramme 2 (= 80 °C), 3 (F_c = 5,9) und 4 (F_c = 15,5) bestehen aus 4 Fraktionen, von denen einige of-

fensichtlich eine besonders große Thermostabilität besitzen. Die Intensität der am weitesten kathodisch positionierten Banden ist im Pherogramm 2 deutlich höher als in den Proteinmustern 3 (F_c = 5,9) und 4 (F_c = 15,5).

Durch Vergleich mit dem auf demselben Gel fokussierten nativen Schaffleischextrakt läßt sich feststellen, daß die in diesem Proteinmuster besonders stark ausgeprägten Fraktionen auch in den Pherogrammen aus erhitztem und hitzesterilisiertem Schaffleisch dominieren. Die Pherogramme 3 und 4 unterscheiden sich nur sehr geringfügig, d.h., daß die Proteinfraktionen, die nach der Hitzebehandlung mit F_c = 5,9 noch nachweisbar sind, auch durch Anwendung von F_c = 15,5 nicht signifikant verändert werden.

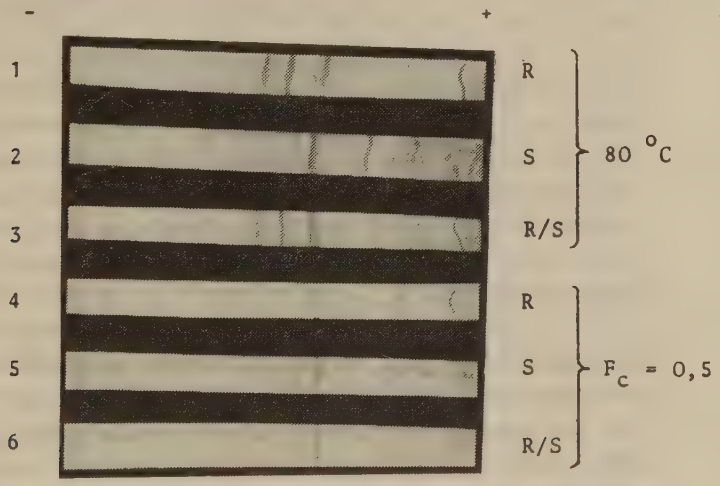

Abb. 2: UIEF, pH-Bereich 3-10
Pherogramme aus hitzebehandeltem (80 °C; F = 0,5) Rind- und Schweinefleisch sowie deren Mischungen (50:50 Gew.%)

R = Rindfleisch, S = Schweinefleisch, R/S = Fleischmischung aus Rind- und Schweinefleisch

Zu Abb. 2

An diesen Trennungen, die auf einem Gel mit dem pH-Bereich 3-10 durchgeführt wurden, wird die Reduzierung der Anzahl der Banden durch Erhöhung der thermischen Belastung von 80 °C-Kerntemperatur (Pherogramme 1-3) auf F_c = 0,5 (Pherogramme 4-6) demonstriert.

Die Pherogramme 1-3 (80 °C) zeigen, daß in diesem z.B. zur Brühwurstherstellung technologisch interessanten Temperaturbereich mehrere Unterschiede hinsichtlich Position, Anzahl und Intensität der Banden auftreten. Die Differenzierung von hitzesterilisiertem Rind- und Schweinefleisch (Pherogramm 4 und 5) stützt sich vergleichsweise auf wenige Unterschiede. Das Rindfleisch bzw. der Rindfleischanteil in den Fleischmischungen läßt sich eindeutig durch die im anodischen Gebiet am weitesten marginal befindliche Fraktion identifizieren. Für die Differenzierung von Schweine- und Rindfleisch (Pherogramm 4 und 5) ist diese Fraktion von Bedeutung, weil sie aufgrund ihrer offensichtlich besonders hohen Thermostabilität, Position und Intensität wesentlich zur Charakterisierung des Rindfleischpherogramms beiträgt.

Die Pherogramme aus Fleischmischungen stellen eine Addition der Proteinmuster der beiden Tierarten dar, wobei die Charakteristika der einzelnen Mischungskomponenten ihrem Anteil entsprechend mehr oder weniger stark ausgeprägt sind.

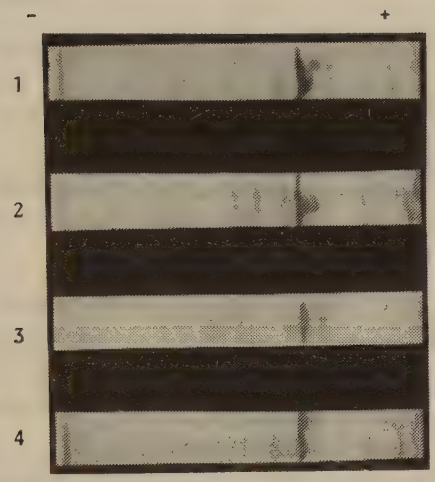

Abb. 3: UDIEF, pH-Bereich 3-10
Hitzesterilisiertes (F_c = 15,5) Schweine-, Rind-, Schaf- und Känguruhfleisch

Zu Abb. 3

Die auf diesem Gel (pH-Bereich 3-10) aufgetrennten Extrakte wurden aus hitzesterilisiertem Fleisch vier verschiedener Tierarten hergestellt. Zur Sterilisation wurde dieses Fleisch, entsprechend der Herstellung von Tropenkonserven, mit F_c-Werten über 15 behandelt.

Obwohl die Pherogramme nur aus wenigen Banden bestehen, lassen sich dennoch Unterschiede zwischen den 4 Proteinmustern nachweisen. Die Pherogramme in Abb. 3 wurden densitometrisch ausgewertet. Auf diese Weise lassen sich die einzelnen Fraktionen, auch die schwach ausgeprägten, objektiv darstellen und anhand der zugehörigen Retentionszeiten (= Zahl über dem Peak) exakt benennen.

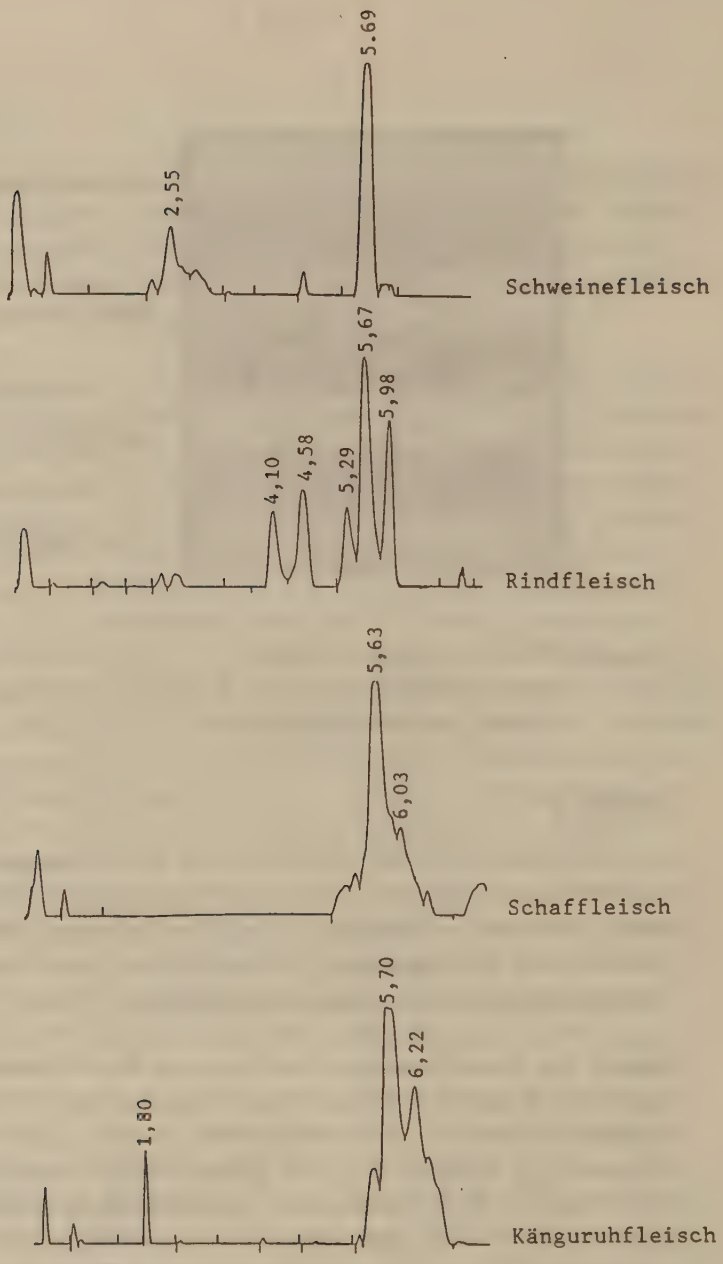

Abb. 4:
Densitometrische Darstellung der Muskelproteinmuster von hitzesterilisiertem (F_c = 15,5) Schweine-, Rind-, Schaf- und Känguruhfleisch

Zu Abb. 4:

Die Unterschiede der vier zu vergleichenden Pherogramme ergeben sich aus dem Vorhandensein bzw. Fehlen bestimmter Banden.

Folgende Fraktionen (gekennzeichnet durch Retentionszeiten) wurden zur Differenzierung der vier Pherogramme herangezogen:

- Schweinefleisch : 2,55; 5,69
- Rindfleisch : 4,10; 4,58; 5,29; 5,67; 5,98
- Schaffleisch : 5,63; 6,03
- Känguruhfleisch : 1,80; 5,70; 6,22

Obwohl die Unterschiede nicht so zahlreich sind wie bei Proteinmustern aus nativem Fleisch, reichen sie dennoch aus, um eine Differenzierung von Fleisch aus Konserven mit hohem F_c-Wert durchzuführen.

Bei der Auswertung der Pherogramme ist wie bei der Untersuchung von nativem Fleisch zu berücksichtigen, daß eine Identifizierung nur anhand entsprechender Referenzextrakte, die auf demselben Gel aufgetrennt wurden, durchgeführt werden sollte, weil mit pH-Gradientenverschiebungen stets gerechnet werden muß.

Inwieweit die in dieser Arbeit dargestellten Pherogramme Tierart- oder evtl. nur Gattungsspezifität besitzen, muß durch weitere Untersuchungen ermittelt werden.

4. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Einsetzbarkeit der Elektrofokussierung in 0,5-mm- und 0,1-mm-Polyacrylamidgelen zur Tierartenbestimmung in Extrakten aus frischem nativem, unter verschiedenen Bedingungen gelagertem und hitzebehandeltem Fleisch untersucht.

Bei frischem nativem und gelagertem Fleisch wurde die Anfärbung der Fokussierergebnisse mit Coomassie-Blue, bei hitzebehandeltem Fleisch mit der Silberfärbung durchgeführt. Die Pherogramme wurden größtenteils densitometrisch ausgewertet.

In Teil A wurden frische native Muskelfleischproben von Rindern, Hausschweinen und Minipigs auf inter- und intraindividuelle sowie geschlechtsspezifische Unterschiede untersucht.

In den Pherogrammen wurden Unterschiede festgestellt, die sich lediglich auf die Konzentrationen einzelner Fraktionen, aber nicht auf das gesamte vorhandene Spektrum bezogen. Die quantitativen Pherogrammabweichungen traten in unsystematischen, untypischen Variationen auf.

Es konnten somit anhand der Proteinmuster weder Rückschlüsse auf das einzelne Individuum innerhalb einer Tierart noch auf sein Geschlecht gezogen werden. Auch für die Herkunft der Fleischproben aus unterschiedlichen Tierkörperregionen ergaben sich keine charakteristischen Merkmale in den Pherogrammen. Die Tierartspezifität der Proteinspektren blieb trotz der quantitativen Differenzen in allen Fällen eindeutig erhalten.

In Teil B wurde am Beispiel des Rindfleisches untersucht, inwieweit die Isoelektrofokussierung zur Tierartendifferenzierung aus gelagertem Fleisch einsetzbar ist. Als Untersuchungsmaterial wurde Muskelfleisch (Roastbeef) von 4 männlichen Rindern verwendet. Die einzelnen Fleischproben wurden unterschiedlichen Lagerungsbedingungen unterworfen.

Die Modifikationen der Lagerungsbedingungen umfaßten vier verschiedene Temperaturbereiche (-18 °C, +4 °C, +10 °C, +20 °C) und 2 Verpackungsarten (aerobe und Vakuumverpakkung). Nach Ablauf der jeweiligen Lagerdauer wurde aus jeder Fleischprobe ein wäßriger Extrakt hergestellt, der zur Fokussierung eingesetzt wurde. Die resultierenden Pherogramme wurden auf Veränderungen in Abhängigkeit von verschiedenen Lagerungsbedingungen untersucht.

Die Fleischproben, die nach organoleptischer Beurteilung in ihrer Verkehrsfähigkeit nicht beeinträchtigt waren, zeigten in den entsprechenden Pherogrammen keine Veränderungen. Abweichungen vom tierartspezifischen Referenzpherogramm aus frischem Fleisch wurden bei den Fleischproben erst dann festgestellt, wenn sie bereits ausgeprägte sinnfällige Verderbniserscheinungen aufwiesen. Die Fokussierung ist daher mit der in dieser Arbeit angewandten Technik zur Tierartendifferenzierung aus infolge Verderbs nicht mehr verkehrsfähigen Fleischproben ungeeignet. Die Anfangsstadien des Verderbs hingegen hatten auf die Tierartspezifität der Pherogramme keinen Einfluß.

Im Teil C wurde mit der Ultradünnschichtfokussierung und anschließender Silberfärbung hitzebehandeltes (80 °C) Rind-, Schweine-, Schaf- und Känguruhfleisch sowie aus Konserven (F_c = 0,5; 5,9 u. 15,5) differenziert.

Der wesentliche Unterschied zur elektrophoretischen Untersuchung nativen Fleisches besteht in der veränderten Anfärbung der Trennergebnisse. Mit der üblicherweise angewandten Coomassie-Blue-Färbung lassen sich die Fokussierergebnisse aus hitzesterilisiertem Fleisch nicht ausreichend visualisieren. Deshalb wurde anstelle der genannten Färbetechnik die wesentlich empfindlichere Silberfärbung angewendet. Auf diese Weise konnten aus hitzebehandeltem Fleisch tierartspezifische Anteile von Proteinfraktionen sichtbar gemacht werden, so daß eine Unterscheidung der untersuchten 3 Fleischarten möglich wurde.

Inwieweit die mit dieser Methode dargestellten Pherogramme tierart- oder evtl. nur gattungsspezifisch sind, muß durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Summary

The study in hand examines the applicability of isoelectric focussing in polyacrylamide gels of 0,5 mm and 0,1 mm thickness for the animal species differentiation of raw meat, heat-processed meat and of meat that had been stored under different conditions.

The results of focussing applied to fresh, non-heated meat and to stored meat were visualized by Coomassie blue stain, the focussing results of heat-treated meat were visualized by a silver staining. The pherograms were evaluated densitometrically for the most part.

Part A analyses inter- and intraindividual as well as sex dissimilarities of fresh, non-heated beef, pork and minipig muscle.

The pherograms did show dissimilarities only within concentrations of some fractions but not within the protein pattern as a whole. The quantitative pherogram deviations could not be specified, as they appeared in unsystematical and untypical variations.

Consequently, no inferences could be drawn on the basis of the protein pattern, neither about the single individual within one animal species nor about its sex. Concerning the different locations of the meat samples in the body of the animal the pherograms also presented no characteristic signs.

In spite of the quantitative differences the specific protein spectra of the different animal species remained in all cases unequivocally stable.

Part B uses the example of beef to analyse to what extent isoelectric focussing is applicable to the animal species differentiation of stored meat.

Muscle meat (roastbeef) of four oxen was used as test material. The single meat samples were submitted to different conditions of storage. The modifications of storing conditions included four different zones of temperature (-18 °C, +4 °C, +10 °C, +20 °C) and two types of packing (aerobe and vacuum packing).

After the respective time of storage an aqueous extract of each muscle sample was prepared and applied to focussing. The resulting pherograms were examined with regard to alterations depending on different storing conditions.

Meat samples whose palatability was not affected according to organoleptic judgement showed no alterations in the corresponding pherograms. Deviations from the specific animal species reference pherogram of fresh meat were only found when the meat samples showed obvious and distinct signs of decay. The technique of focussation as applied in this study is therefore inappropriate for the animal species differentiation of meat no longer palatable because of decay. The initial stages of decay, however, did not have any influence on the specific protein spectra of the pherograms.

In Part C ultra-thin-layer-focussation and subsequent silver staining have been used for the differentiation of canned beef, pork, mutton and kangaroo meat from fully sterilized preserves. The essential difference between this method and that of the electrophoretic examination of non-heated meat consists in a different staining of

the gels. The results of focussing applied to heat-sterilized meat cannot be sufficiently visualized by means of the commonly used Coomassie blue stain. For this reason, this staining technique was replaced by the much more sensitive silver stain. In this way specific shares of protein fractions of heat-sterilized meat could be visualized so that the three kinds of meat under examination could be differentiated.

It should be elucidated by further studies to what extent the pherograms established by this method are specific of an animal species or perhaps only of a genus.

5. Literaturverzeichnis

ABERLE, E.D. u. R.A. MERKEL (1966)
Solubility and electrophoretic behaviour of some proteins of post-mortem aged bovine muscle.
J. Food Sci. 31, 151 - 156

ABRAMS, R., R. VERBEKE u. J. van HOOF (1983)
Fish species identification by isoelectric focusing: the use of schematic patterns.
Fleischwirtsch. 63, 1459 - 1462

ABRAMS, R., R. VERBEKE u. J. van HOOF (1984)
Identifizierung der Fischarten mittels isoelektrischer Fokussierung.
Fleischwirtsch. 64, 622 - 624

ALLEN, R.C. (1982)
The silver stain and present application in electrophoresis.
Elektrophorese-Forum 1982, 40 - 52
(Hrsg.: RADOLA, B.J., Institut für Lebensmitteltechnologie, TU München)

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG
(L 06.00/17) 1983, Band I/2
Nachweis der Tierart aus frischem nativem Muskelfleisch in Polyacrylamid-Gelen mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung.

(L 06.00/23) 1986, Band I/2
Bestimmung des Proteingehaltes nach der Biuret-Methode in Lösungen für immunologische Untersuchungen in Fleisch und Fleischerzeugnissen.

Beuth-Verlag, Berlin

BABIKER, S.A., P.A. GLOVER u. R.A. LAWRIE (1980-81)
Improved methodology for the electrophoretic determination of horse meat in heated foodstuffs.
Meat Sci. 5, 473 - 477

BARTEN, U. (1965)
Immunologische Untersuchungen an einigen wasserlöslichen Muskeleiweißen.
Inaug.-Diss., Freie Universität Berlin

BASS, A., D. BRDICZKA, P. EYER, S. HOFER u. D. PETTE (1969)
Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level of enzymatic organization.
Eur. J. Biochem. 10, 198 - 206

BAUER, F. (1981)
Identifizierung nahe verwandter Tierarten mittels ultradünnschicht isoelektrischer Fokussierung.
Proc. 27. Eur. Fleischf. Kongr., Wien, 602 - 604

BAUER, F. u. H. STACHELBERGER (1984)
Nachweis von Blutplasma in erhitzten Fleischwaren mittels Ultradünnschicht-isoelektrischer Focussierung.
Z. Lebensm.-Unters. Forsch. 178, 86 - 89

BERSON, G. (1983)
Silver staining of proteins in polyacrylamide gels: increased sensitivity by a blue toning.
Anal. Biochem. 134, 230 - 234

BURGER, M., A. LAWEN u. O.H.W. MARTINI (1983)
Eine vereinfachte Form der Coomassie-Blau-Elution zur Quantifizierung proteingebundenen Farbstoffes; Untersuchung des Entfärbevorganges.
Elektrophorese-Forum 1983, 380 - 386
(Hrsg.: RADOLA, B.J., Institut für Lebensmitteltechnologie, TU München)

COHEN, E.H. (1966)
Protein changes related to ham processing temperatures. Effect of time-temperature on amount and composition of soluble proteins.
J. Food Sci. 31, 746 - 750

CORETTI, K. (1957)
Eine Schnellmethode zum Nachweis der ausreichenden Erhitzung in Dosenschinken.
Fleischwirtsch. 9, 113 - 115

CRESPO, F.L. u. H.W. OCKERMAN (1977)
SDS-polyacrylamide electrophoresis pattern alteration of myofibrillar proteins after heating of avian leg and breast muscle.
J. Food Prot. 40, 261 - 264

DECKER, R., D. HOLPERT, H.-H. POTT u. K. PLEIN (1985)
Erfahrungen zum Einsatz der isoelektrischen Fokussierung auf Polyacrylamidgel (PAGIF) in der Fleischhygiene.
Fleischwirtsch. 65, 857 - 861
Fleischwirtsch. 65, 960 - 962

DE WREEDE, I. (1982)
Na-Dodecylsulfat (SDS) als analytisches Hilfsmittel in der Lebensmittelchemie. Fraktionierung, Bestimmung und Differenzierung von Proteinen, insbesondere in Fleisch und Fleischerzeugnissen.
Inaug.-Diss., Technische Universität Carolo-Wilhelmina, Braunschweig

DE WREEDE, I., H. STEGEMANN u. H.H. HEINERT (1982)
Proteine in Brühwurst, Löslichkeit und elektrophoretische Bewertung.
Z. Lebensm.-Unters. Forsch. 174, 366 - 373

DE WREEDE, I. u. H. STEGEMANN (1982)
Trennung von Muskelprotein, Kollagen und Elastin durch fraktionierte Extraktion mit Na-dodecylsulfat (SDS)-Lösungen.
Z. Lebensm.-Unters. Forsch. 174, 200 - 207

Deutsches Lebensmittelbuch (1984)
Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse.
Seite 23. Bundesanzeiger Verlagsges. Köln

DION, A.S. u. A.A. POMENTI (1983)
Ammoniacal silver staining of proteins of glutaraldehyde enhancement.
Anal. Biochem. 129, 490 - 496

DLABKA, A. (1984a)
Einsetzbarkeit der Isoelektrofokussierung zur Tierartenidentifizierung aus frischem nativem Muskelfleisch.
Tierärztl. Umsch. 39, 343

DLABKA, A. (1984b)
Ultradünnschichtfokussierung in Polyacrylamidfertiggelen unterschiedlicher pH-Bereiche zur Tierartendifferenzierung aus frischem nativem Muskelfleisch.
ALTS-Protokoll 1984, 55 -56

DLABKA, A. (1985)
Tierartendifferenzierung aus hitzesterilisiertem Fleisch mittels Isoelektrofokussierung und anschließender Silberfärbung.
Berl. Münch. tierärztl. Wochenschr. 98, 130 - 135

EBERMANN, R. u. J. BARNA (1972)
Untersuchung des Preßsaftes aus Rind-, Schweine-, Kalb-, Schaf-, Pferde- und Hühnerfleisch sowie des aus Rindertalg und Schweinespeck extrahierten Eiweißes durch Polyacrylamidgelelektrophorese.
Z. Lebensm.-Unters. Forsch. 2, 341 - 343

EGLI, R.A. (1965)
Einfluß des Erhitzens auf die Bestandteile der Lebensmittel.
Dechema-Monographien 56, (976 - 992), 131 - 152
Verlag Chemie, Weinheim

EICHLER, D. u. K. RUBACH (1982)
Untersuchung von thermisch und nicht-thermisch konservierten Fischerzeugnissen.
Elektrophorese-Forum 1982, 157 - 160
(Hrsg.: RADOLA, B.J., Institut für Lebensmitteltechnologie, TU München)

ESCHENBRUCH, M. u. R.R. BÜRK (1982)
Experimentally improved reliability of ultrasensitive silver staining of protein in polyacrylamide gels.
Anal. Biochem. 125, 96 - 99

Fleischbeschaugesetz (FlBG 15. Lfg. Juni 1983), § 3, S. 18/1
in: Das Schlachttier- und Fleischbeschaugesetz
Erläuterte Textausgabe, 6. Auflage
Spindler/Theurer, Kienzle/Braun

FUJIMAKI, M. u. F.E. DEATHERAGE (1964)
Chromatographic fractionation of sarcoplasmatic proteins of beef skeletal muscle on ion-exchange cellulose.
J. Food Sci. 29, 316 - 326

FRIEDMANN, R.D. (1982)
Comparison of four different silver-staining techniques for salivary protein detection in alkaline polyacrylamide gels.
Anal. Biochem. 126, 346 - 349

FROMM, G., I. LANGHELD u. J. WURZIGER (1964)
Zum Nachweis von Fleischkonserven-Verfälschungen.
Arch. Hyg. Bakteriol. 148, 244 - 260

FÜHRLING, D. u. Chr. GERSONDE (1980)
Erfahrungen mit der isoelektrischen Fokussierung bei der Tierartenbestimmung.
Lebensmittelchem. gerichtl. Chem. 34, 135 - 138

GERBER, C. (1980)
Zur Anwendung der Elektrofokussierung (abschließende Stellungnahme).
ALTS-Protokoll, November 1980, 6 - 7

GERBER, C. u. F. UNTERMANN (1980)
Zur Anwendung der Elektrofokussierung bei der Unterscheidung von Eiweißen verschiedener Tierarten.
ALTS-Protokoll, April 1980, 17 - 18

GILES, B.G. (1962)
Species differences observed in the sarcoplasmatic proteins of mammalian muscle.
J. Sci. Food Agric. 13, 264 - 268

GISSEL, C. (1978)
Vergleichende Untersuchungen am abgelagerten Frischfleisch verschiedener Tierarten über Veränderungen von Purinsubstanzen und Eiweißen und deren Bedeutung als hygienischer Parameter.
Habil.-Schr., Tierärztl. Hochschule, Hannover

GODAVARI BAI, S. u. B.J. RADOLA (1977)
Characterization of fish sarcoplasmic proteins by thin-layer gel chromatography and thin-layer isoelectric focusing.
Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. 5, 33 - 37

GÖRG, A., W. POSTEL u. R. WESTERMEIER (1978)
Ultrathin-layer isoelectric focusing in polyacrylamide gels on cellophane.
Anal. Biochem. 89, 60 - 70

GÖRG, A., W. POSTEL u. R. WESTERMEIER (1979a)
Ultradünnschicht-isoelektrische Fokussierung und Ultradünnschicht-Elektrophorese in Polyacrylamidgel auf Folie.
GIT Labor-Medizin 2, 32 - 40

GÖRG, A., W. POSTEL u. R. WESTERMEIER (1979b)
Ultrathin-layer horizontal electrophoresis, isoelectric focusing, and protein-mapping in polyacrylamide gels on cellophane.
Electrophoresis '79, 67 - 78
Walter de Gruyter & Co., Berlin

GÖRG, A., W. POSTEL u. R. WESTERMEIER (1979c)
Ultradünnschicht-isoelektrische Fokussierung in 0,12 mm-Polyacrylamid-Gelen auf Polyesterfolie.
Z. Lebensm.-Unters. Forsch. 168, 25 - 28

GÖRG, A., W. POSTEL u. R. WESTERMEIER (1982a)
SDS-electrophoresis of legume seed proteins in horizontal ultrathin-layer pore gradient gels.
Z. Lebensm.-Unters. Forsch. 174, 282 - 285

GÖRG, A., W. POSTEL u. R. WESTERMEIER (1982b)
Ultrathin-layer isoelectric focusing, electrophoresis and protein-mapping of must and wine proteins.
Recent Development in Food Analysis, 264 - 268
EURO FOOD CHEM I 1981 (Wien)
Verlag Chemie, Weinheim

GÖTZE, U. (1974)
Elektrophoretische Untersuchungen des Muskelpreßsaftes gesunder normalgeschlachteter, notgeschlachteter und verendeter Schlachtschweine zur Bestimmung des Ausblutungsgrades im Fleisch.
Fleischwirtsch. 54, 234 - 239

GRAU, R. (1968)
Einflüsse auf Beschaffenheit und Zusammensetzung des Fleisches.
in: Handbuch der Lebensmittelchemie, Bd. III, 2. Teil, 1088 - 1093
Springer-Verlag, Berlin

GRAU, R. (1969)
Chemischer Aufbau des Fleisches.
in: Fleisch und Fleischwaren.
Verlag Paul Parey, Berlin
S. 49 - 56: Eiweiß
S. 89 - 108: Post mortem Vorgänge
S. 125 - 140: Erhitzen und Denaturieren

GROSSKLAUS, D. (1964)
Untersuchungen zum histologischen Nachweis von Verfälschungen bei Krustentierkonserven.
Arch. Lebensmittelhyg. 15, 6 - 8

GRUNDHÖFER, F. (1982)
Tierartenbestimmung in der Lebensmittelüberwachung mit Hilfe der Ultradünnschicht-isoelektrischen Fokussierung auf miniaturisierten Gelen.
Elektrophorese-Forum 1982, 174 - 177
(Hrsg.: RADOLA, B.J., Institut für Lebensmitteltechnologie, TU München)

HAMM, R. (1965)
Einfluß des Erhitzens auf tierisches Gewebe.
Dechema-Monographien 56, (976 - 992), 159 - 170
Verlag-Chemie, Weinheim

HAMM, R. (1972)
Kolloidchemie des Fleisches.
114 - 118
Verlag Paul Parey, Berlin

HAMM, R. (1977)
Veränderungen der Muskelproteine beim Erhitzen von Fleisch.
Fleischwirtsch. 57, 1846 - 1860

HAMM, R. u. F.E. DEATHERAGE (1960)
Changes in hydratation, solubility and charges of muscle proteins during heating of meat.
Food Res. 25, 587 - 610

HAUROWITZ, F. (1960)
Eiweißdenaturierung.
in: Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse.
4. Bd., 1. Teil, 116 - 125
Springer-Verlag, Berlin

HEINERT, H.H. u. A. KLINGER (1978)
Tierartspezifische Eiweißdifferenzierung. Polyacrylamidgelelektrophorese zum Nachweis der Tierart.
Fleischwirtsch. 58, 1490 - 1491

HEINERT, H.H. u. A. KLINGER (1980)
Tierartspezifische Eiweißdifferenzierung. Protein- und Enzymmuster bei Reh (Capreolus capreolus) und Hirsch (Cervus elaphus).
Fleischwirtsch. 60, 1682 - 1683

HEUKESHOVEN, J. u. R. DERNICK (1983)
Vereinfachte und universelle Methode zur Silberfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen: Bemerkungen zum Mechanismus der Silberfärbung.
Elektrophorese-Forum 1983, 92 - 97
(Hrsg.: RADOLA, B.J., Institut für Lebensmitteltechnologie, TU München)

HOFMANN, K. (1973)
Identifizierung und Bestimmung von Fleisch und Fremdeiweiß mit Hilfe der Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Elektrophorese.
Z. Anal. Chem. 267, 335 - 361

HOFMANN, K. (1978)
Einsatz der Gelelektrophorese von Proteinen in der Lebensmittelüberwachung zur Lösung schwieriger analytischer Probleme. Charakterisierung des Eiweißes von Organen bei Rind und Schwein mit Hilfe der SDS-Elektrophorese.
Jahresbericht der Bundesanstalt für Fleischforschung (1978), Kulmbach

HOFMANN, K. (1982)
Chemie der Eiweißstoffe.
Fleischwirtsch. 62, 1432 - 1437

HOFMANN, K. (1986)
Grundlegende Probleme bei der Identifizierung der Tierart von Muskelfleisch mit Hilfe elektrophoretischer Methoden.
Fleischwirtsch. 66, 91 - 98

HOFMANN, K. u. I.F. PENNY (1971)
Identifizierung von Soja- und Fleischeiweiß mittels Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese.
Fleischwirtsch. 51, (4), 577 - 578

ICMSF (International commission on microbiological specifications for foods 1980)
Microbial ecology of foods. Vol. II
Academic Press, New York

JAENICKE, R. (1965)
Wärmeaggregation und Wärmedenaturierung von Proteinen.
Dechema-Monographien, (976 - 992), 207 - 238
Verlag Chemie, Weinheim

JAY, J.M. (1978)
Modern food microbiology.
D. van Nostrand Company, New York

KABAT, E.A. (1971)
Einführung in die Immunchemie und Immunologie.
Springer-Verlag, Berlin

KAFFEHR, B. (1962)
Untersuchung der Reifungs- und Verfallsprozesse in den verschiedenen Fleischarten.
zit. nach GRAU, R. (1969)
in: Fleisch und Fleischwaren. Post mortem Vorgänge: S. 107 . Verlag Paul Parey, Berlin

KAISER, K.P., G. MATHEIS, Ch. KMITA-DÜRRMANN u. H.D. BELITZ (1980a)
Identifizierung der Tierart bei Fleisch, Fisch und abgeleiteten Produkten durch Proteindifferenzierung mit elektrophoretischen Methoden.
Z. Lebensm.-Unters. Forsch. 170, 334 - 342

KAISER, K.P., G. MATHEIS, Ch. KMITA-DÜRRMANN u. H.D. BELITZ (1980b)
Proteindifferenzierung mit elektrophoretischen Methoden bei Fleisch, Fisch und abgeleiteten Produkten.
Z. Lebensm.-Unters. Forsch. 171, 415 - 419

KAISER, K.P., G. MATHEIS, D. SCHWEIGER-RECKNAGEL u. H.D. BELITZ (1981)
Differenzierung pflanzlicher und tierischer Proteine durch isoelektrische Fokussierung in Agarosegel.
Z. Lebensm.-Unters. Forsch. 173, 468 - 470

KAISER, K.-P. u. I. KRAUSE (1985)
Analytik von Proteinen in Lebensmitteln mit elektrophoretischen und chromatographischen Verfahren.
Z. Lebensm. Unters. Forsch. 180, 181 - 201

KARLSON, P. (1984)
Kurzes Lehrbuch der Biochemie.
Proteine. S. 35 - 56
Thieme Verlag, Stuttgart

KING, N.L. (1978)
Isoelectric variants of actin in raw and cooked meat.
Meat Sci. 2, 313 - 321

KING, N.L. (1984)
Species identification of cooked meats by enzyme-staining of isoelectric-focusing gels.
Meat Sci. 11, 59 - 72

KING, N.L. u. L. KURTH (1982)
Analysis of raw beef samples for adulterant species by enzyme-staining of isoelectric focusing gels.
J. Food Sci. 47, 1608 - 1612.

KINZHOFER, A., M. MEIER u. B.J. RADOLA (1983)
Schnelle und vereinfachte Silberfärbung von Proteinen bei der Ultradünnschicht-isoelektrischen Fokussierung.
Elektrophorese-Forum 1983, 282 - 286
(Hrsg.: RADOLA, B.J., Institut für Lebensmitteltechnologie, TU München)

KÖNIG, M.J. (1982)
Untersuchung von Muskelproteinen mit Hilfe der Elektrophorese und Fokussierung zur Differenzierung von Haus- und Wildschweinen.
Inaug.-Diss., Tierärztl. Hochschule Hannover

KOSSMANN, H. (1969)
Untersuchung von Proteinen der Skelettmuskulatur des Rindes mit Hilfe der Stärkegelelektrophorese.
Inaug.-Diss., Landwirtschaftl. Fakultät, Universität Göttingen

KRONMANN, M.J. u. R.J. WINTERBOTTOM (1960)
Post mortem changes in the water-soluble proteins of bovine skeletal muscle during aging and freezing.
J. Agric. Food Chem. 8, 67 - 72

KRONMANN, M.J., L.E. WEINBERGER u. R.J. WINTERBOTTOM (1960)
The water-soluble proteins of bovine skeletal muscle.
Arch. Biochem. Biophys. 86, 238 - 250

KRZYNOWEK, J. u. K. WIGGIN (1979)
Identification of species in cooked crabmeat by thin layer isoelectric focusing.
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 62, 630 - 636

LAWRIE, R.A. (1970)
Fleischkunde. 86 - 104
BVL Verlagsgesellschaft, München

LAWRIE, R.A., W. POMEROY u. A. CUTHBERTSON (1963)
Studies on the muscles of meat animals.
3. Comparative composition of various muscles in pigs of three weight groups.
J. Agric. Sci. 60, 195 - 209

LEE, A. u. R. GRAU (1966)
Verhalten von Rindersarkoplasma beim Erhitzen.
Fleischwirtsch. 46, (11), 1239 - 1240

LEISTNER, L. (1979)
Mikrobiologische Einteilung von Fleischkonserven.
Fleischwirtsch. 59, 1452 - 1455

LINKE, H. (1968)
Eigenschaften des Fleisches.
in: Handbuch der Lebensmittelchemie, 3. Bd., Teil 2, 989 - 997
Springer-Verlag, Berlin

LITTERSCHEID, F. u. H. LAMBARDT (1921)
Die Erkennung der Haare unserer Haussäugetiere und einiger Wildarten.
Verlag von Reimann & Co., Hamm (Westf.)

LLEWELLYN, J.W. u. B. FLAHERTY (1976)
The detection and estimation of soya protein in food products by isoelectric focusing.
J. Food Sci. Technol. 11, 555 - 563

LOCHTE, Th. (1938)
Atlas der menschlichen und tierischen Haare.
Verlag Dr. Schops, Leipzig

LUNDSTROM, R.C. (1979)
Fish species identification by thin layer isoelectric focusing.
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 62, 624 - 629

LUNDSTROM, R.C. (1981)
Rapid fish species identification by agarose gel isoelectric focusing of sarcoplasmic proteins.
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 64, 38 - 43

MACKIE, I.M. (1968)
Species identification of cooked fish by disk electrophoresis.
Analyst 93, 458 - 460

MACKIE, I.M. u. T. TAYLOR (1972)
Identification of species of hot-sterilized canned fish by polyacrylamide-disk-electrophoresis.
Analyst 97, 609 - 611

MÄKINEN, A., I. DE WREEDE, H. STEGEMANN u. H.H. HEINERT (1979)
Löslichkeit und gel-elektrophoretische Muster hitzedenaturierter Proteine, auch von stärkehaltigen Proben, nach Einwirkung von Na-dodecylsulfat (SDS).
Z. Lebensm.-Unters. Forsch. 168, 282 - 285

MATTEY, M., A.L. PARSONS u. R.A. LAWRIE (1970)
Quantitative identification of meat species after heating.
Food Technol. 5, 41 - 46

MEIENHOFER, J. u. H. ZAHN (1960)
Gewinnung und Reindarstellung von Proteinen.
in: HOPPE-SEYLER-THIERFELDER (1960)
Handbuch der physiologischen und pathologisch-chemischen Analyse.
Bausteine des Tierkörpers, Bd. IV/1, S. 11
Springer-Verlag, Berlin

MERRIL, C.R., M. HARRINGTON u. V. ALLEY (1984)
A photodevelopment silver stain for the rapid visualization of proteins separated on polyacrylamide gels.
Electrophoresis 5, 289 - 297

MORRISSEY, J.H. (1981)
Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity.
Anal. Biochem. 117, 307 - 310

MOUSTAFA, E.K., H. STEGEMANN u. N. ANTONACOPOULOS (1982)
Elektrophoretische Differenzierung hitzedenaturierter eisgelagerter Fischproteine.
Z. Lebensm.-Unters. Forsch. 175, 199 - 202

NAUJOK, W. (1985)
Darstellung des Proteinmusters der Muskulatur von Haus- und Wildtieren mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung auf Polyacrylamidgelen (PAGIF) unter den Gesichtspunkten der Reifung und der Probenauswahl der Muskulatur sowie des Alters und der Haltung der Tiere.
Inaug.-Diss., Fachbereich Veterinärmedizin, FU Berlin

OAKLEY, B.R., D.R. KIRSCH u. N.R. MORRIS (1980)
A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels.
Anal. Biochem. 105, 361 - 363

OHLENSCHLÄGER, G., I. BERGER u. W. DEPNER (1980)
Synopsis der Elektrophorese-Techniken. S. 70
G-I-T Verlag Ernst Giebeler, Darmstadt

OLSMAN, W.J., W.H.C. HOUTEPEN u. C.M. LEEUWEN (1969)
Elektrophoretischer Nachweis von fleischfremden Eiweißen in Fleischerzeugnissen:
Z. Lebensm.-Unters. Forsch. 141, 253 - 259

PERRY, S.V. (1970)
Biochemical adaption during development and growth in skeletal muscle.
in: BRISKEY, E.J., R.G. CASSENS and B.B. MARSH
The physiology and biochemistry of muscle as food.
University of Wisconsin Press, S. 537 - 553

PFEIFFER, G., L. KOTTER, D. BÖHM u. P. GLATZEL (1969)
Zum Nachweis der vorausgegangenen Hitzeeinwirkung auf Fleisch und Fleischerzeugnisse mittels eines neuentwickelten Carbesterasetests.
Fleischwirtsch. 49, 209 - 211

PFEIFFER, G., R. WELLHÄUSER u. H. GEHRA (1970)
Weitere Erfahrungen mit dem Carbesterase-Erhitzungsnachweis bei brühwurstartigen Fleischprodukten.
Arch. Lebensmittelhyg. 21, 250 - 252

PLEIN, K. (1984)
Untersuchungen zum Einsatz der isoelektrischen Fokussierung auf Polyacrylamidgel (PAGIF) in der Fleischhygiene.
Inaug.-Diss., Justus-Liebig-Universität Gießen

POEHLING, H.M. u. V. NEUHOFF (1981)
Visualization of proteins with a silver "stain": A critical analysis.
Electrophoresis 2, 141 - 147

PROTZ, D. u. A. DLABKA (1984)
Hinweise zur Methode der isoelektrischen Fokussierung mit Polyacrylamidgelen (PAGIF) in der Tierartendifferenzierung aus Fleisch.
Vortrag, O.I.E.-Kongreß, Wien 1984

RADOLA, B.J. (1980)
Ultradünnschicht-isoelektrische Fokussierung.
GDCH-Fortbildungskurs; April 1980
RADOLA, B.J., TU München

RAMPTON, J.H., A.F. ANGLEMIER u. M.W. MONTGOMERY (1965)
Fractionation of bovine sarcoplasmic proteins by DEAE-cellulose chromatography.
J. Food Sci. 30, 636 - 640

REHBEIN, H. (1983)
Identifizierung der Fischart bei salz- und hitzegegarten Fischprodukten durch Ultradünnschicht-isoelektrische Fokussierung.
Elektrophorese-Forum 1983, 271 - 275
(Hrsg.: RADOLA, B.J., Institut für Lebensmitteltechnologie, TU München)

REUTER, G. (1972)
Vorkommen und Bedeutung von psychrotrophen Mikroorganismen im Fleisch.
Arch. Lebensmittelhyg. 23, 272 - 275

RIGHETTI, P.G. (1983)
Isoelectric focusing: theory, methodology and applications.
Elsevier Biomedical Press, Amsterdam

RIGHETTI, P.G. u. A.B. BOSISIO (1982)
Applications of isoelectric focusing of the analysis of food proteins.
Recent development in food analysis. S. 247 - 263
Verlag Chemie, Weinheim

RIGHETTI, P.G. u. J. DRYSDALE (1976)
Isoelectric focusing.
North-Holland, Amsterdam/Oxford
American Elsevier, New York

RING, Ch., P. WEIGERT u. L. HELLMANNSBERGER (1982)
Zur Differenzierung von Eiweiß pflanzlichen und tierischen Ursprungs mittels Disk-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese.
Fleischwirtsch. 62, 648 - 650

RUBACH, K., E. KIRCHHOFF u. Ch. BREYER (1978)
Dünnschichtelektrofokussierung in Polyacrylamid zur Bestimmung der Tierart durch Proteindifferenzierung.
Sonderdruck, Fa. LKB, München/Gräfelfing

SAMMONS, D.W., D. ADAMS u. E.E. NISHIZAWA (1981)
Ultrasensitive silver-based color staining of polypeptides in polyacrylamide gels.
Electrophoresis 2, 135 - 141

SCHMOLDT, R. (1969)
Versuche zum serologischen Nachweis der Erhitzung von Kochschinken.
Inaug.-Diss., Institut für Lebensmittelhygiene, FU Berlin

SECCHIA, C., P.A. BIONDI, A. BERNINI, G. SONCINI u. P. CATTANEO (1980)
Isoelectric focusing of meat proteins in the presence of urea and nonionic detergent.
Arch. Vet. Ital. 31, 138 - 140

SHARP, J.G. (1963)
Aseptic autolysis in rabbit and bovine muscle during storage at 37 °C.
J. Sci. Food Agric. 14, 468 - 479

SINELL, H.-J. (1968a)
Tierspecies-Identifizierung mittels serologischer Methoden.
in: Handbuch der Lebensmittelchemie, 3. Bd., Teil 2, S. 1240 - 1244
Springer-Verlag, Berlin

SINELL, H.-J. (1968b)
Probleme bei der Spezies-Identifizierung von Proteinen in Lebensmitteln.
Arch. Lebensmittelhyg. 19, 121 - 125

SINELL, H.-J. (1985)
Einführung in die Lebensmittelhygiene. 2. Auflage
Verlag Paul Parey, Berlin

SINELL, H.-J. u. I. MENTZ (1969)
Serologische Species-Identifizierung hitzedenaturierter Muskelproteine mittels Harnstoffextraktion.
Berlin. Münch. Tierärztl. Wochenschr. (3), 55 - 58

SINELL, H.-J. u. R. SCHMOLDT (1972)
Immunelektrophoretischer Nachweis der Erhitzung von Kochschinken.
Fleischwirtsch. 52, 459 - 462

SPELL, E. (1972)
Nachweis von Milcheiweiß und Sojaeiweiß in Fleischerzeugnissen mit Hilfe der vertikalen Flachgel-Disk-Elektrophorese.
Fleischwirtsch. 52, 1451 - 1452 452

SPELL, E. (1974)
Die elektrophoretische Unterscheidung verschiedener Fleischarten.
Fleischwirtsch. 54, 533 - 538

STOLLE, A. u. G. REUTER (1981)
Kriterien zur Erkennung unzulässig gewonnenen Schweinefleisches.
Fleischwirtsch. 61, 1179 - 1186

STOLLE, A., K. TROEGER u. G. REUTER (1983)
Isoelektrische Fokussierung in Polyacrylamidgel zur Erkennung von Veränderungen im Proteinmuster unzulässig gewonnenen Schweinefleisches (Scheinschlachtungen) unter Berücksichtigung unterschiedlicher Reifestadien.
Fleischwirtsch. 63, 1315 - 1319

STROBL, A. (1957)
Untersuchung über die Denaturierung von Muskeleiweißkörpern bei der Fleischzerkleinerung.
Inaug.-Diss., Universität München

SWITZER, R.C., C.R. MERRIL u. S. SHIFRIN (1979)
A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels.
Anal. Biochem. 98, 231 - 237

THOMPSON, R.R. (1960)
Species identification by starch gel zone electrophoresis of protein extracts.
I. Fish
J. Assoc. Off. Agric. Chem. 43, 763 - 764

THOMPSON, R.R. (1961)
Species identification by starch gel zone electrophoresis of protein extracts.
II. Meat and eggs.
J. Assoc. Off. Agric. Chem. 44, 787 - 788

THOMPSON, R.R. (1962)
Identification of fish species by starch gel zone electrophoresis of protein extracts.
J. Assoc. Off. Agric. Chem. 45, 275 - 276

TINBERGEN, B.J. u. W.J. OLSMAN (1976)
Isoelektrische Fokussierung als eine Technik zur Speziesidentifizierung in der Lebensmittelüberwachung.
Fleischwirtsch. 56, 1495 - 1498

WEINBERG, B. u. D. ROSE (1960)
Changes in protein extractability during post-rigor tenderization of chicken breast muscle.
Food Technol. 14, 376 - 379

6. ANHANG

(PHERO- UND DENSITOGRAMME AUS TEIL A UND B)

aus Teil A: Abbildungen 1 - 7
aus Teil B: Abbildungen 1a - 9a

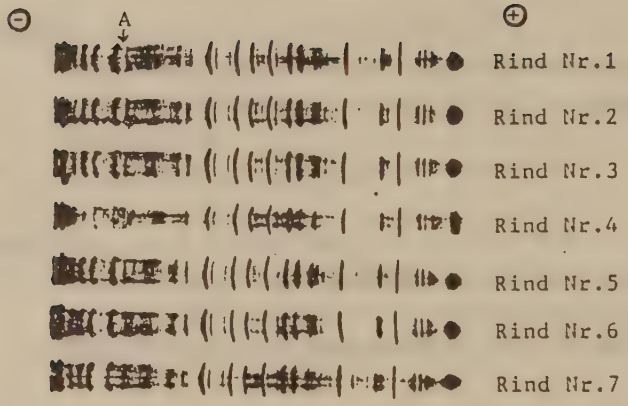

Abb. 1

Pherogramme aus Rindfleischextrakten (Roastbeef, 24 h post mortem) von 7 männlichen Rindern

(A = Auftragposition)

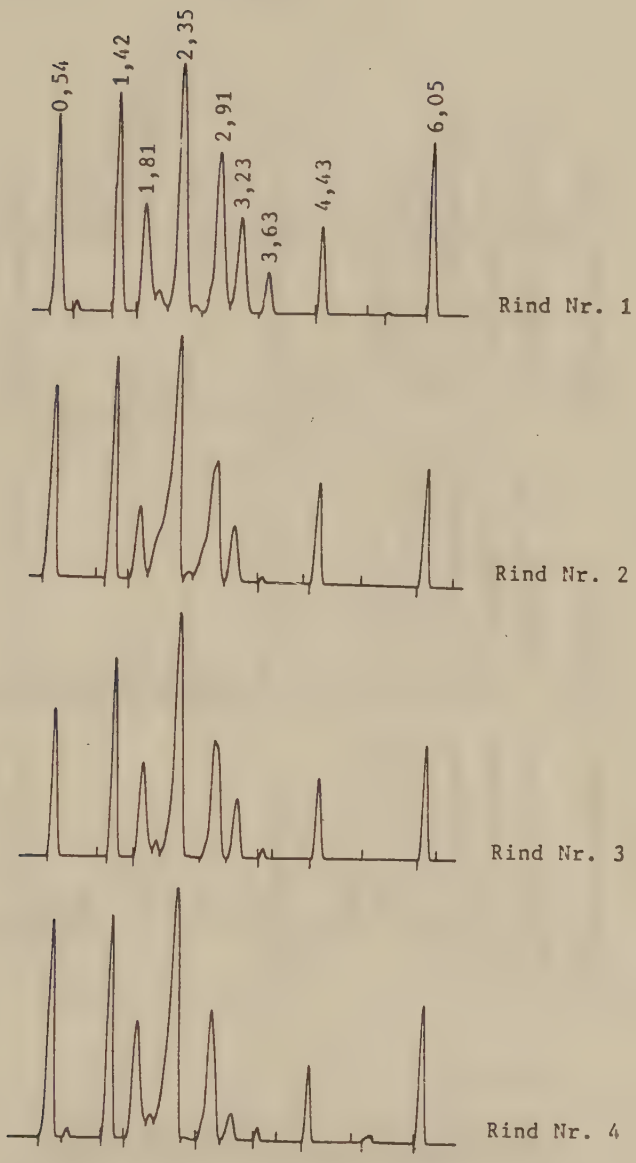

Abb. 2

Densitogramme aus Rindfleischextrakten (Roastbeef, schlachtwarm) von 4 männlichen Rindern

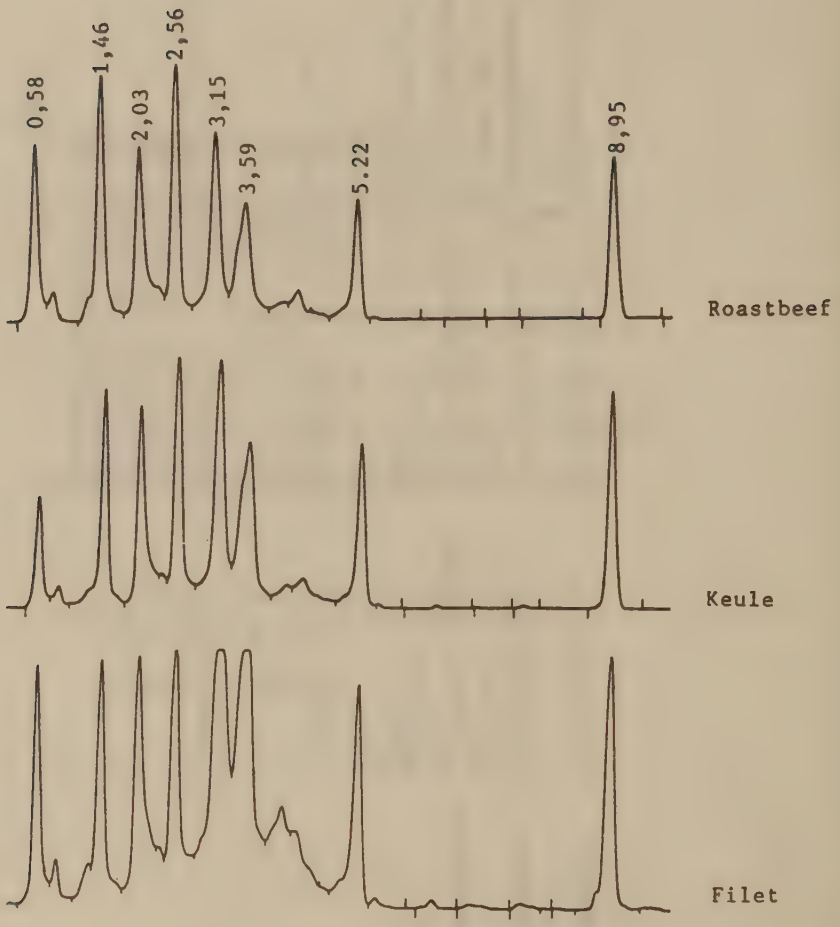

Abb. 3

Densitogramme aus Rindfleischextrakten
(3 Lokalisationen) eines Individuums

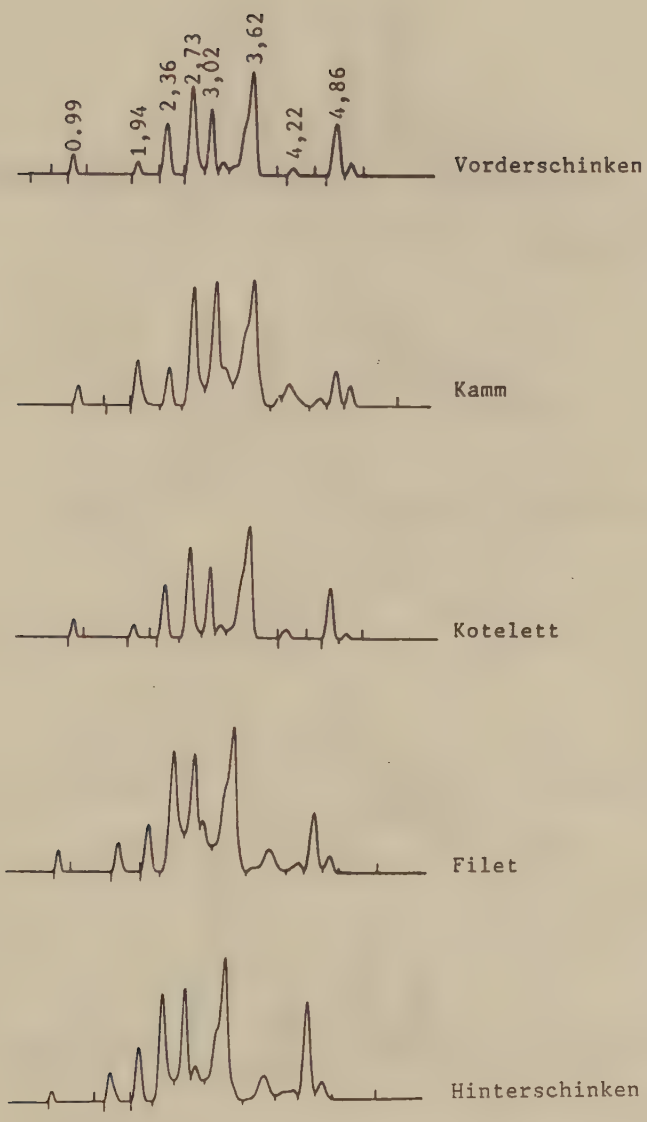

Abb. 4

Densitogramme aus Hausschweinefleisch-extrakten (5 Lokalisationen) eines Individuums

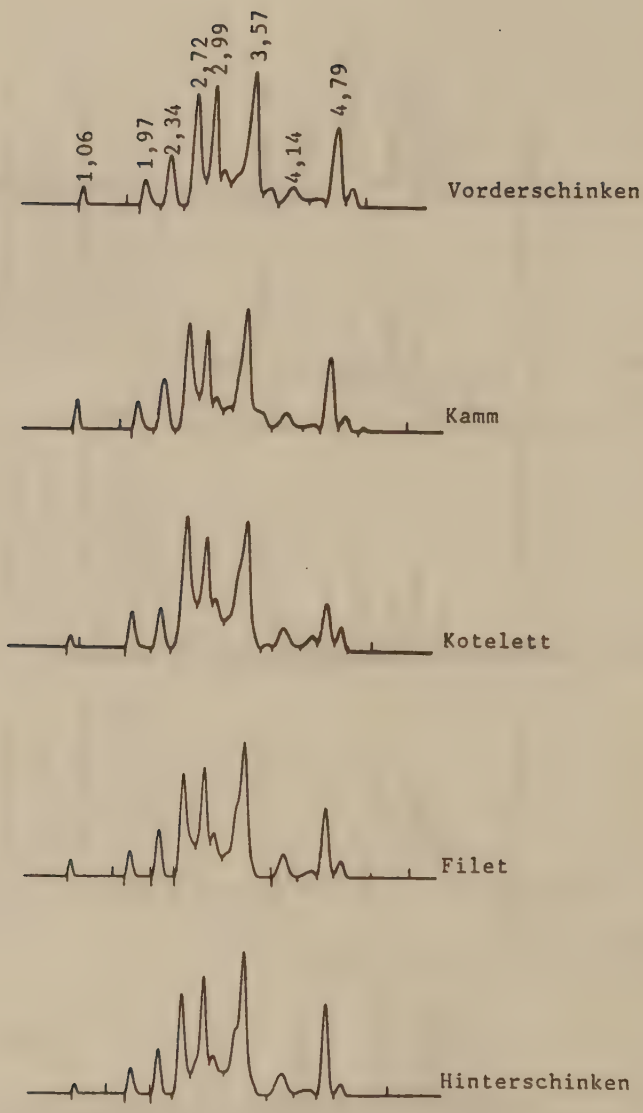

Abb. 5

Densitogramme aus Minipigfleischextrakten (5 Lokalisationen) eines Individuums

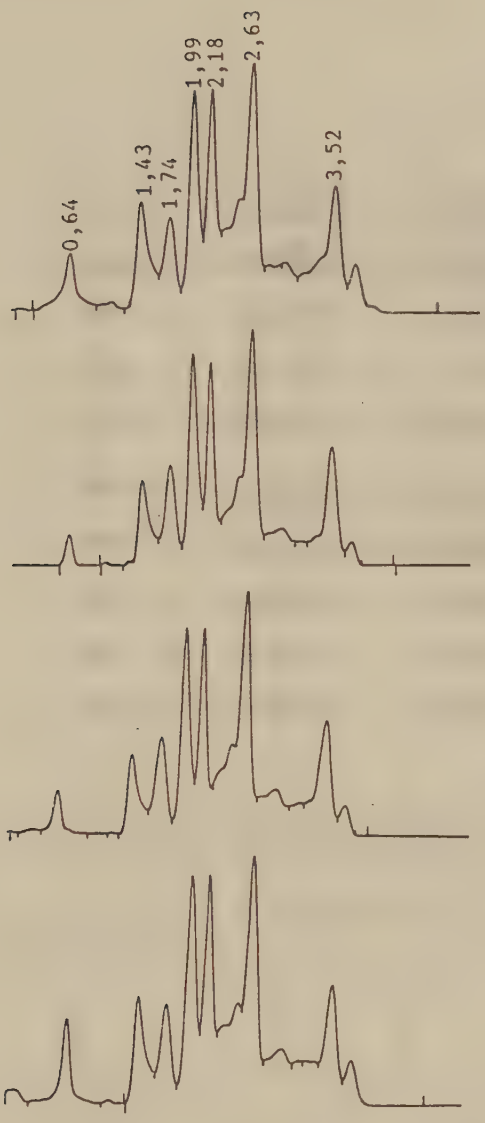

Abb. 6

Densitogramme aus Minipigfleischextrakten von Tieren unterschiedlichen Geschlechts

Abb. 7

Pherogramme aus Minipigfleischextrakten (5 Lokalisationen) von 2 Individuen unterschiedlichen Geschlechts

Vs = Vorderschinken; Ka = Kamm; Ko = Kotelett; F = Filet; Hs = Hinterschinken

(A = Auftragposition)

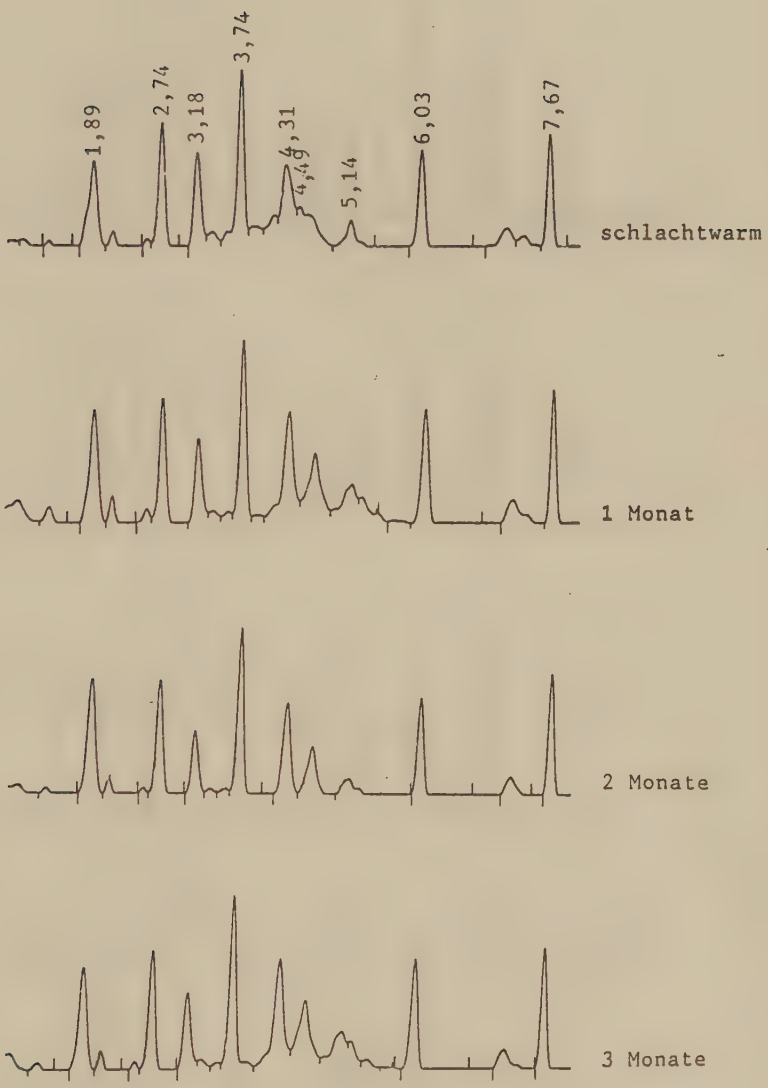

Abb. 1a

Densitogramme aus schlachtwarmem und gelagertem Rindfleisch
Lagerungsbedingungen: -18°C, vakuumverpackt, bis zu 3 Monaten gelagert

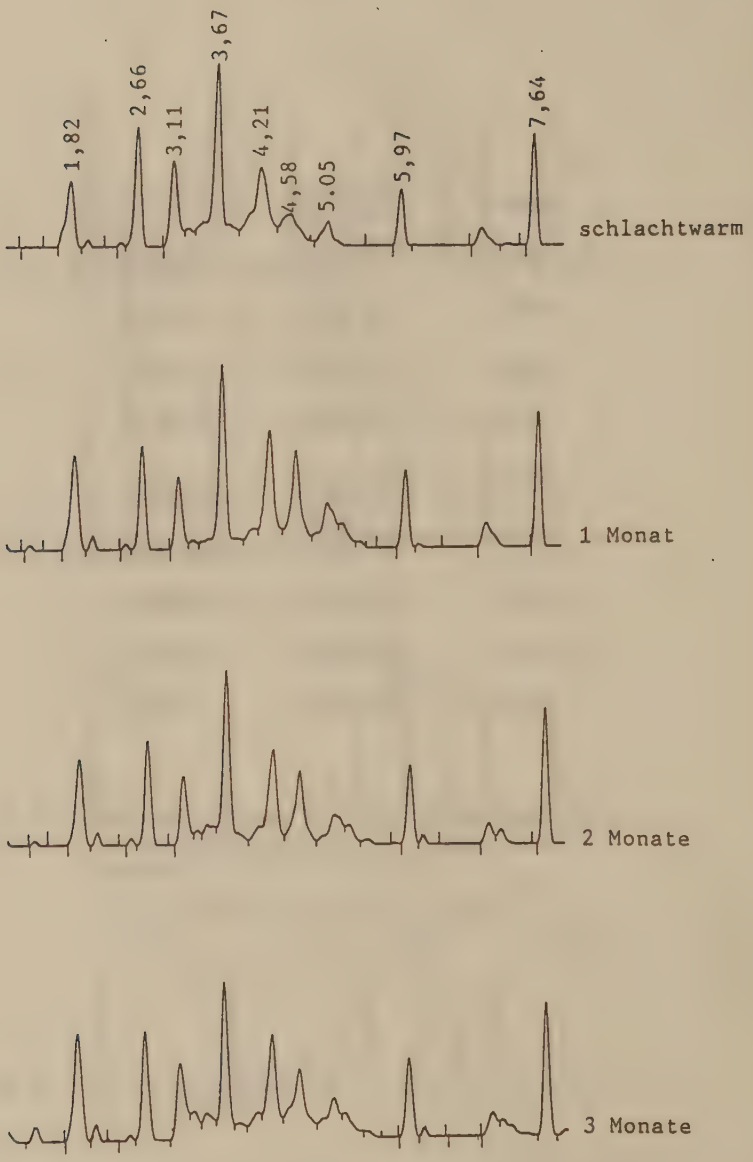

Abb. 2a

Densitogramme aus schlachtwarmem und gelagertem Rindfleisch
Lagerungsbedingungen: -18°C, aerob verpackt, bis zu 3 Monaten gelagert

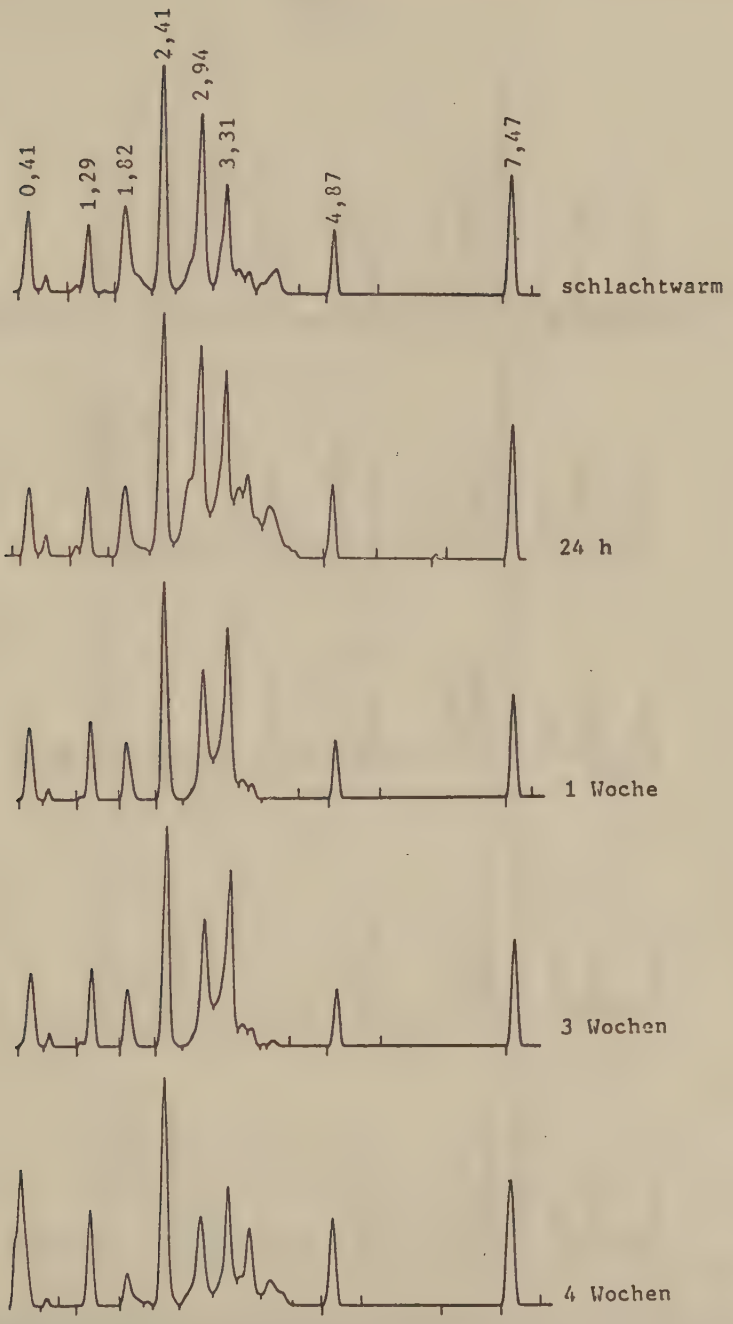

Abb. 3a
Densitogramme aus schlachtwarmem und gelagertem Rindfleisch
Lagerungsbedingungen: +4 °C, vakuumverpackt, bis zu 4 Wochen

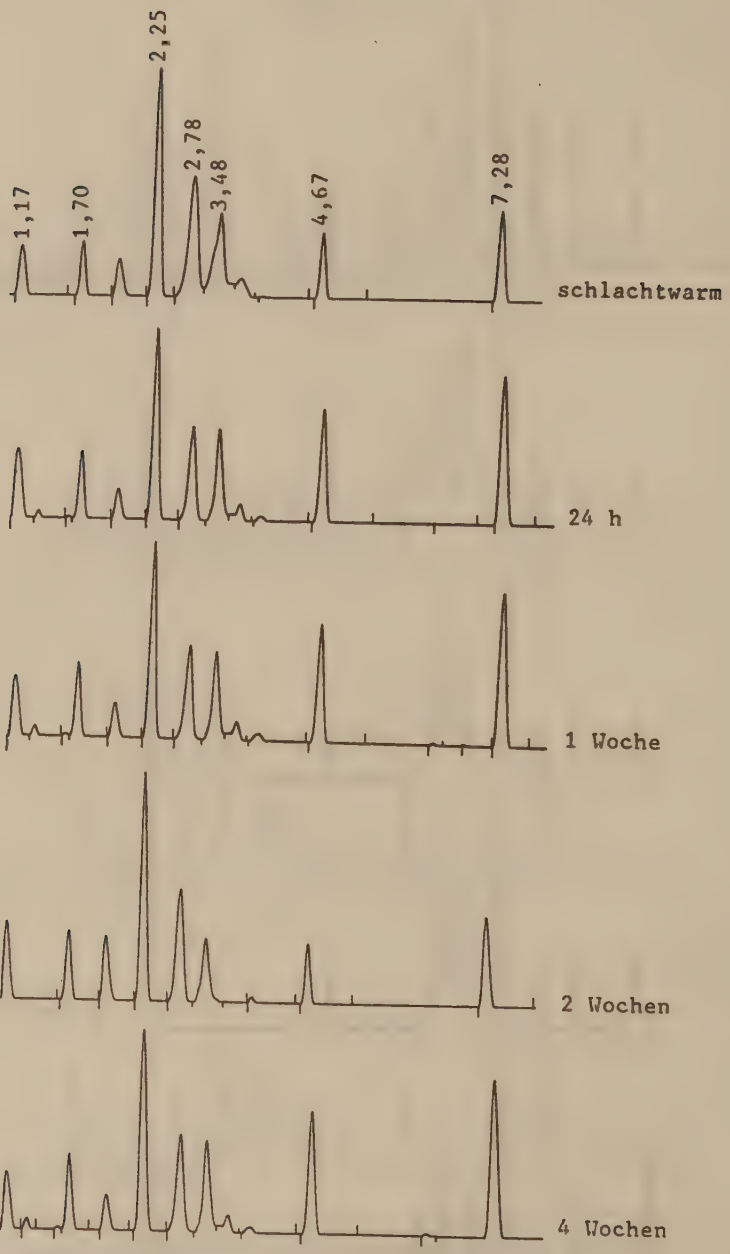

Abb. 4a

Densitogramme aus schlachtwarmem und gelagertem Rindfleisch
Lagerungsbedingungen: +4 °C, aerob verpackt, bis zu 4 Wochen

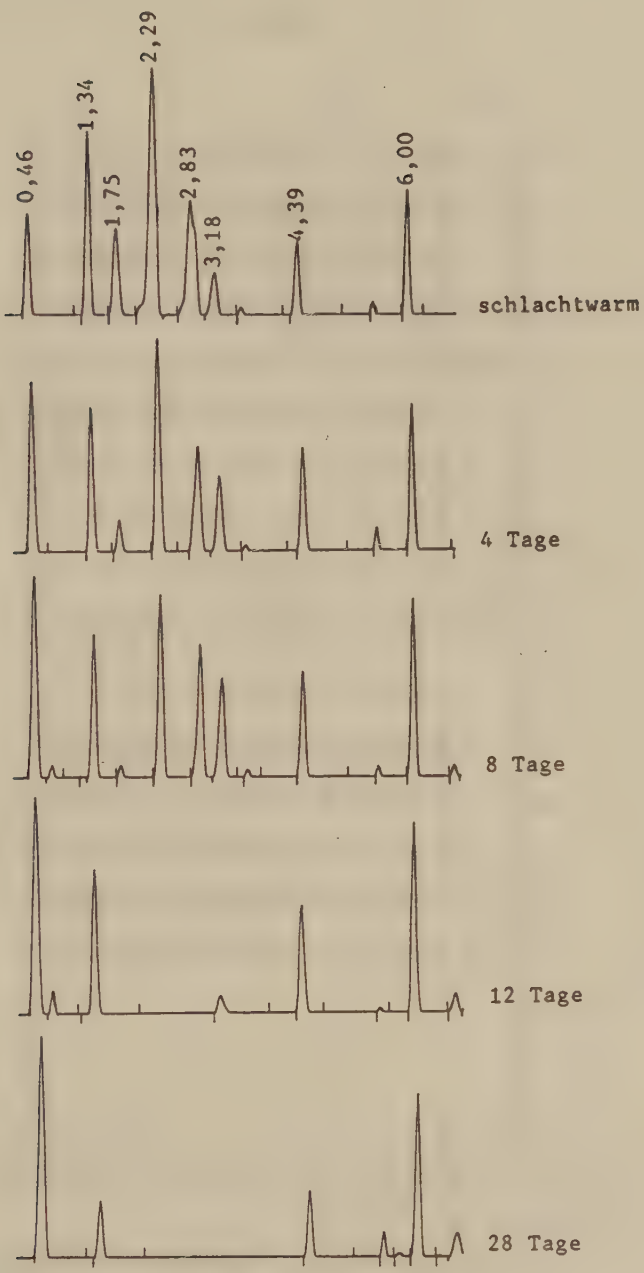

Abb. 5a

Densitogramme aus schlachtwarmem und gelagertem Rindfleisch
Lagerungsbedingungen: +10 °C, vakuumverpackt, bis zu 28 Tagen

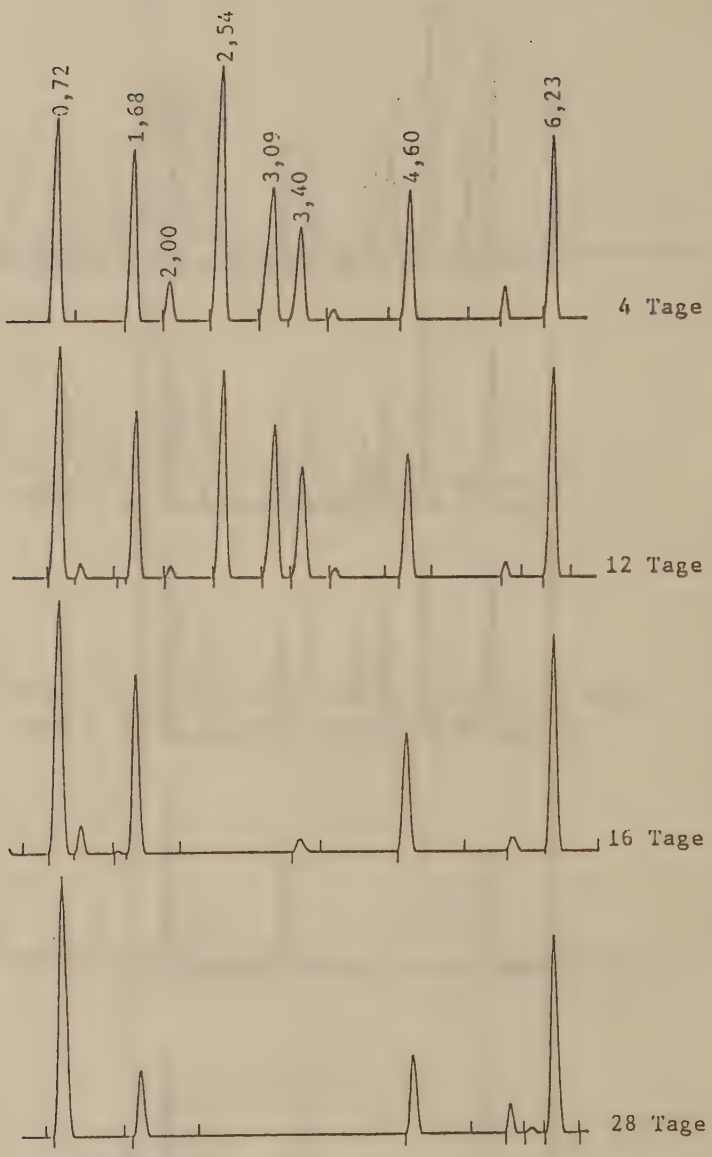

Abb. 6a

Densitogramme aus gelagertem Rindfleisch

Lagerungsbedingungen: +10 °C, aerob verpackt, bis zu 28 Tagen gelagert

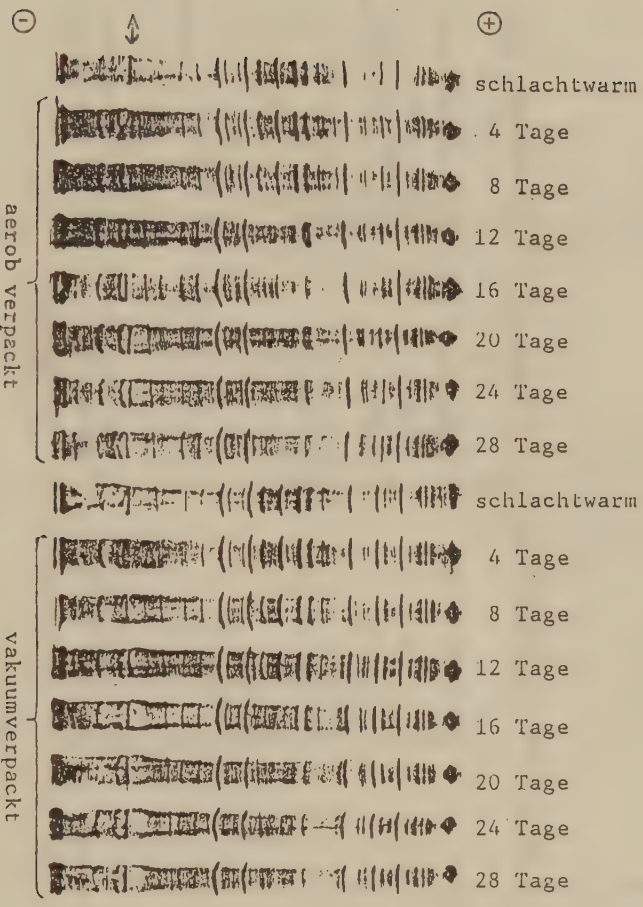

Abb. 7a

Pherogramme aus schlachtwarmem und gelagertem Rindfleisch

Lagerungsbedingungen: +10 °C, aerob bzw. vakuumverpackt, bis zu 28 Tagen gelagert

A = Auftragposition

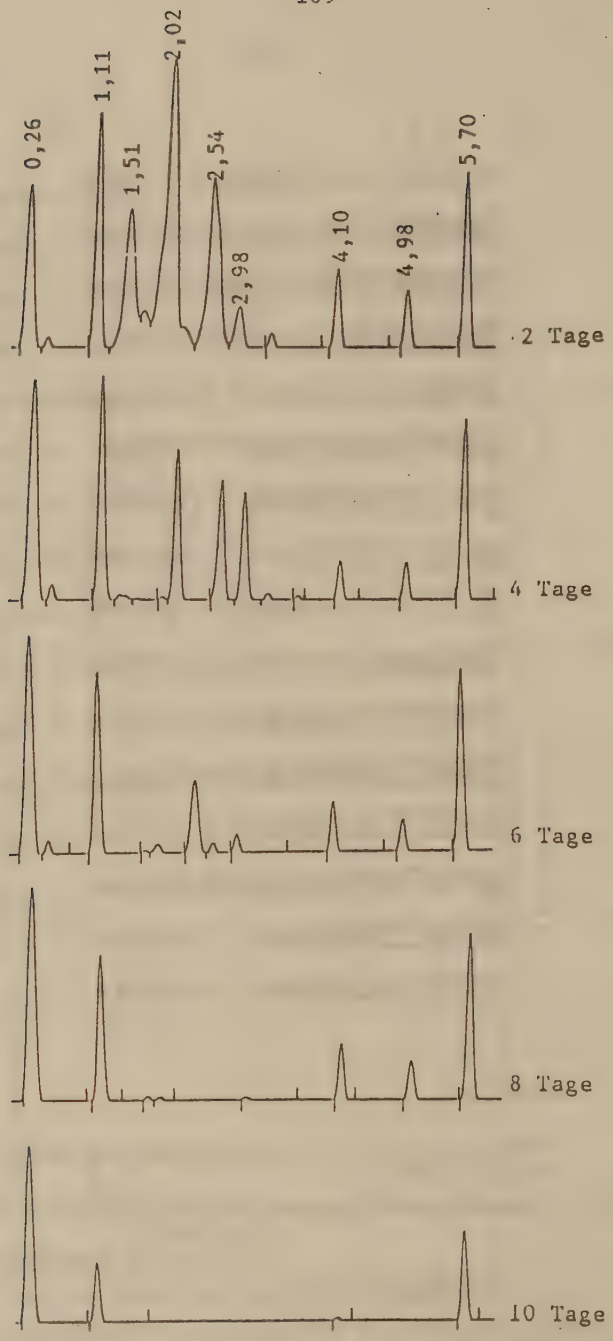

Abb. 8a

Densitogramme aus gelagertem Rindfleisch
Lagerungsbedingungen: +20 °C, vakuumverpackt,
bis zu 10 Tagen gelagert

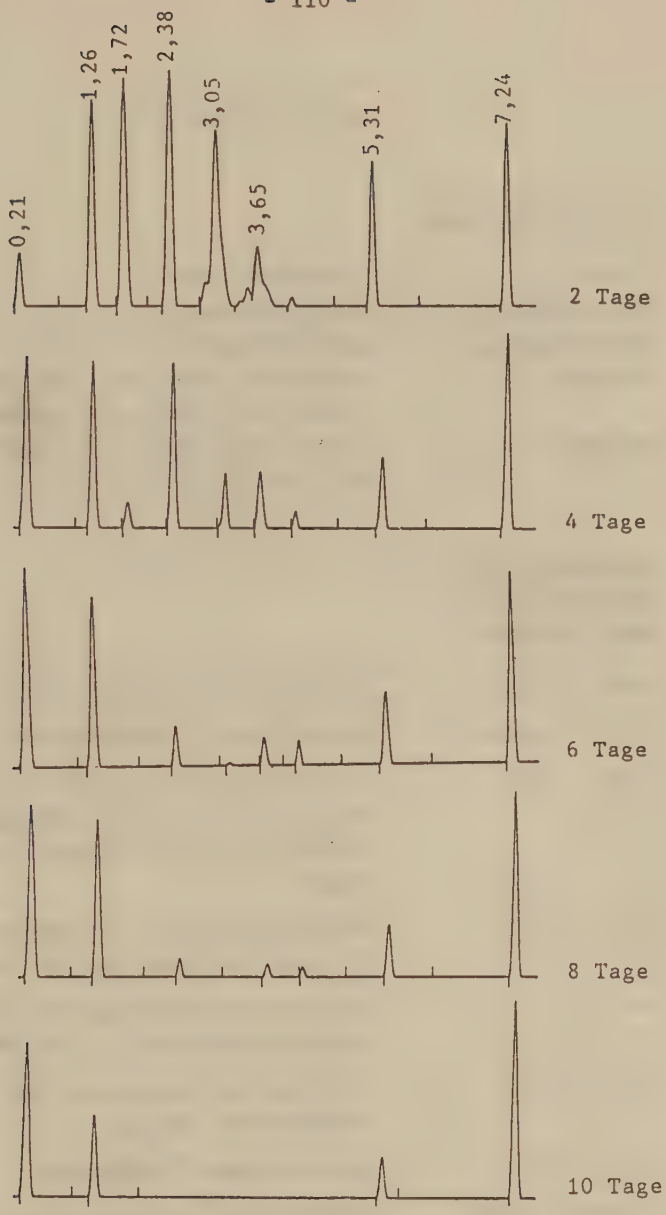

Abb. 9a

Densitogramme aus gelagertem Rindfleisch

Lagerungsbedingungen: +20 °C, aerob verpackt,
bis zu 10 Tagen gelagert

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Annemarie Dlabka
Geburtsdatum:	24. Juni 1949
Geburtsort:	Löhne (Westf.)
Eltern:	Heinrich Ledebrink, Landwirt, und Luise Ledebrink, geb. Westermann
Ehestand:	seit dem 6. April 1979 verheiratet mit Uwe Dlabka, 1 Kind

Schulbildung, Berufsausbildung und -ausübung

1955 - 1960	Grundschule in Löhne (Westf.)
1960 - 1966	Realschule in Löhne (Westf.)
1966 - 1968	Ausbildung zur Chemotechnikerin an der staatlich anerkannten privaten Chemieschule Dr. Blindow in Bückeburg
1968 - 1974	Berufstätigkeit als Chemotechnikerin in Instituten und in der Industrie
Mai 1974	Abitur am Abendgymnasium (Peter-A.-Silbermann-Schule) in Berlin
1975 - 1980	Studium der Tiermedizin an der Freien Universität Berlin
August 1980	Staatsexamen Tiermedizin
November 1980	Approbation als Tierärztin
1982 - 1985	Tätigkeit als Tierärztin an Forschungsvorhaben im Bundesgesundheitsamt und dem Landesuntersuchungsinstitut in Berlin

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. H.-J. Sinell für die Überlassung des Themas, die Anregungen und die Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Versuche und der Abfassung der Arbeit.

Für die eingeräumten Arbeitsmöglichkeiten bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. D. Grossklaus, Präsident des Bundesgesundheitsamtes und vormaliger Leiter des Instituts für Veterinärmedizin - Robert von Ostertag-Institut - des Bundesgesundheitsamtes Berlin.

Allen Mitarbeitern dieses Instituts, die mich bei meinen Arbeiten ideell und manuell unterstützt haben, möchte ich ebenfalls herzlich danken.